

**GEBELİK SÜRESİNCE VE DOĞUM SONRASINDA UYGULANAN  
AKRİLAMİDİN, SIÇAN YAVRULARININ TESTİS  
FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ VE E VİTAMİNİNİN KORUYUCU ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI**

**Sevinç GÜLTEKİN**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

**Yüksek Lisans Tezi – 2022**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GEBELİK SÜRESİNCE VE DOĞUM SONRASINDA UYGULANAN  
AKRİLAMİDİN, SIÇAN YAVRULARININ TESTİS FONKSİYONLARI  
ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ VE E VİTAMİNİNİN  
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Sevinç GÜLTEKİN**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ**

Bu Araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje no:TYL-2019-1953) tarafından desteklenmiştir.

**MALATYA  
2022**

# İÇİNDEKİLER

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                                        | vii  |
| ABSTRACT.....                                                     | viii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                               | ix   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                             | xi   |
| TABLolar DİZİNİ .....                                             | xii  |
| 1. GİRİŞ .....                                                    | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                           | 3    |
| 2.1. Fetusun Morfolojik Gelişimi .....                            | 9    |
| 2.2. Akrilamid .....                                              | 10   |
| 2.2.1. Akrilamidin Kimyasal Yapısı ve Sentezi.....                | 10   |
| 2.2.2. Gıda Kaynaklı Akrilamidin Oluşumu.....                     | 12   |
| 2.2.3. Akrilamidin Gıdalarda Bulunuşu.....                        | 13   |
| 2.2.4. Gıda Kaynaklı Akrilamid Oluşumunu Azaltma Yöntemleri ..... | 16   |
| 2.3. Akrilamidin Toksik Etkileri.....                             | 17   |
| 2.3.1. Akrilamidin Nörotoksik Etkisi.....                         | 18   |
| 2.3.2. Akrilamidin Kanserojen Etkisi .....                        | 19   |
| 2.3.3. Akrilamidin Genotoksik Etkisi .....                        | 19   |
| 2.3.4. Akrilamidin Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri ..... | 19   |
| 2.3.5. Akrilamidin Fetus Gelişimi Üzerindeki Toksik Etkileri..... | 20   |
| 2.4. E Vitamini.....                                              | 21   |
| 2.4.1. E Vitamininin Kimyasal Yapısı .....                        | 22   |
| 2.4.2. E Vitamininin Antioksidan Etki Mekanizması .....           | 23   |
| 2.4.3. E Vitamininin Nöroprotektif Etkisi .....                   | 24   |
| 2.4.4. E Vitamini İçeren Gıdalar .....                            | 24   |
| 3. MATERYAL ve METOT.....                                         | 26   |
| 3.1. Araştırmada Kullanılan Materyaller .....                     | 26   |
| 3.1.1. Kimyasal Malzemeler .....                                  | 26   |
| 3.1.2. Cihazlar.....                                              | 26   |
| 3.1.3. Ratların Temini .....                                      | 26   |
| 3.2. Metotlar.....                                                | 26   |
| 3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Ratların Bakımı .....   | 26   |

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2. Akrilamidve E Vitamini Uygulama Yöntemi .....                                            | 28 |
| 3.2.3. Numunelerin Alınması, Tartılması ve Analizlere Hazırlık İşlemleri.....                   | 28 |
| 3.2.4. Spermiyogram Analizi Yöntemi .....                                                       | 29 |
| 3.2.5. Testis ve Karaciğer Aromataz Geninin mRNA Düzeylerinin RT-PCR ile Analizi.....           | 29 |
| 3.2.6. Testis ve Karaciğer Aromataz Proteini Düzeylerinin Western-Blot Yöntemi ile Analizi..... | 30 |
| 3.2.7. Serum Testosteron, Östradiol, LH, FSH Düzeylerinin Analizi .....                         | 32 |
| 3.2.8. Histopatolojik İnceleme Yöntemi .....                                                    | 32 |
| 3.2.9. Verilerin İstatistiksel Analizi .....                                                    | 32 |
| 4. BULGULAR.....                                                                                | 33 |
| 4.1.Gruplarının Testis, Epididimis, Seminal Vezikül ve Prostat Ağırlıkları .....                | 33 |
| 4.2.Gruplarının Spermiyogram Sonuçları.....                                                     | 33 |
| 4.3. Grupların Aromataz Geni mRNA'sının RT-PCR Sonuçları .....                                  | 34 |
| 4.4. Grupların Testis ve Karaciğer Aromataz Proteininin Western-Blot Sonuçları .....            | 37 |
| 4.5. Grupların Serum Testosteron, Östradiol, FSH ve LH Sonuçları .....                          | 37 |
| 4.6. Grupların Testis Histopatolojisi Sonuçları .....                                           | 38 |
| 4.6.1. Kontrol Grubu Testis Dokusunun Histopatolojik Bulguları.....                             | 39 |
| 4.6.2. AKR GrubuTestis Dokusunun Histopatolojik Bulguları.....                                  | 40 |
| 4.6.3. E Vitamini GrubuTestis Dokusunun Histopatolojik Bulguları.....                           | 41 |
| 4.6.4. AKR+E Vitamini Grubu Testis Dokusunun Histopatolojik Bulguları.....                      | 42 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                               | 43 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                       | 52 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                 | 54 |
| EKLER.....                                                                                      | 66 |
| EK-1. Özgeçmiş.....                                                                             | 66 |
| EK-2. Etik Kurul Onayı .....                                                                    | 67 |

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin her aşamasında bana değerli görüşleriyle yol gösteren, destekleyen ve akademik çalışma disiplini kazandıran danışman hocam sayın Prof.Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e içtenlikle teşekkür ederim.

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta Araş.Gör.Muhammed M. ÜREMİŞ olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma ve hocalarıma minnettarım.

Her zaman yanımda olan bana manevi destek ve moral veren, ablam Doç.Dr.Tuğba GÜLTEKİN başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

### **Gebelik Süresince ve Doğum Sonrasında Uygulanan Akrilamidin, Sıçan Yavrularının Testis Fonksiyonları Üzerindeki Toksik Etkilerinin İncelenmesi ve E Vitamininin Koruyucu Rolünün Araştırılması**

**Amaç:** AKR günlük hayatımızda, özellikle 120 °C'den yüksek sıcaklıklarda hazırlanan gıdaların tüketilmesi ile maruz kaldığımız, sağlık açısından toksik olan bir kimyasaldır. Bu çalışmada, AKR'nin testislerdeki toksik etkilerinin moleküler düzeydeki etki mekanizma/mechanizmalarının ortaya konulması ve AKR kaynaklı bu toksik etkileri E vitamininin önleyip önleyemeyeceğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Bu araştırmada, 40 adet 200-250 gr ağırlığında 12 haftalık erişkin gebe Sprague Dawley rat kullanılmıştır. Gebe ratlar 4 gruba ayrılmıştır: Grup 1: Kontrol grubu (8 rat), Grup 2: AKR grubu (12 rat), Grup 3: E vitamini grubu (8 rat) ve Grup 4: AKR + E vitamini grubu (12 rat). Bu araştırmada anne ratlara gebelik ve laktasyon süresince, erkek yavru ratlara doğum sonrası 8. haftaya kadar AKR ve E vitamini uygulanmış ve 8. haftanın sonunda tüm grupların erkek ratlarından üreme dokuları ve kan numuneleri alınmıştır. Bu dokuların ağırlık ölçümleri, testis dokusunun histopatolojik incelemesi, testis ve karaciğer aromataz geninin mRNA ve protein düzeyleri, serum numunelerinde ise testosteron, östradiol, FSH ve LH analizleri yapılmıştır. Ayrıca, yavru erkek sıçanlardan alınan sperm örneklerinin spermiyogram analizleri gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Analiz sonuçları, AKR uygulamasının testiste ciddi hasarlara neden olduğunu, sperm konsantrasyonunu anlamlı derecede düşürdüğünü, anormal sperm oranını ciddi derecede artırdığını, serum testosteron düzeylerini anlamlı derecede düşürürken östradiol düzeylerini ise anlamlı derecede artırdığını, karaciğerde aromataz proteinini anlamlı derecede artırdığını ortaya koymuştur. E vitamini uygulaması, verileri kontrol grubu değerlerine getirmiştir.

**Sonuç:** Tüm bu sonuçlar, AKR uygulamasının erkek yavru sıçanların üreme performansında önemli derecede bozulmalara neden olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Erkek yavru sıçan, akrilamid, testis, spermiyogram, testosteron, östradiol, aromataz, RT-PCR, western-blot.

## ABSTRACT

### **Investigation of the Toxic Effects of Acrylamide on Testicular Functions and Investigation of the Protective Role of Vitamin E in offsprings Who Received Acrylamide during Pregnancy and Postpartum**

**Aim:** Acrylamide (ACR) is a toxic chemical for health that we are exposed to in our daily life, especially by consuming foods prepared at temperatures higher than 120 °C. In this study, it was aimed to reveal the mechanism(s) of action at the molecular level of the toxic effects of ACR in testicles and to test whether vitamin E can prevent these ACR-induced toxic effects.

**Material and Method:** In this study, 40 adult pregnant Sprague Dawley rats weighing 200-250 g, 12 weeks old, were used. Pregnant rats were divided into 4 groups: Group 1: Control group (8 rats), Group 2: ACR group (12 rats), Group 3: Vitamin E group (8 rats), and Group 4: ACR + vitamin E group (12 rats). In this study, acrylamide and vitamin E were applied to the mother rats during pregnancy and lactation, and to the male offsprings until the 8th week after birth. At the end of the 8th week, reproductive tissues and blood samples were taken from the male offsprings of all groups. Weight measurements of the reproductive tissues, histopathological examination of testicular tissue, mRNA and protein levels of testicular and liver aromatase gene, and testosterone, estradiol, FSH and LH analyzes in serum samples were made. In addition, spermiogram analyzes of sperm samples taken from the male offsprings were performed.

**Results:** Analysis results revealed that ACR application caused serious damage in testis, significantly decreased sperm concentration, significantly increased abnormal sperm rate, significantly decreased serum testosterone levels, significantly increased serum estradiol levels, and significantly increased aromatase protein in the liver. Vitamin E application brought the data to the control group values.

**Conclusion:** All these results show that the application of ACR can cause significant deterioration in reproductive performance of male baby rats.

**Key words:** Male offspring, acrylamide, testis, spermiogram, testosterone, estradiol, aromatase, RT-PCR, Western-blot.

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                                       |                                                                      |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>(CHO)<sub>2</sub></b>              | :Glioksal                                                            |
| <b>(-NH<sub>2</sub>)</b>              | :Amino                                                               |
| <b>(-SH)</b>                          | :Sülfhidril                                                          |
| <b>AA</b>                             | : Amino asit                                                         |
| <b>AKR, ACR</b>                       | : Akrilamid                                                          |
| <b>BYT</b>                            | :Bütün Yumurta Tozu                                                  |
| <b>CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub></b> | :Üre                                                                 |
| <b>CRL</b>                            | : Tepe Oturma Noktası Ölçümü                                         |
| <b>DNA</b>                            | : Deoksiribonükleik Asit                                             |
| <b>E/D</b>                            | : Erkek/Dişi                                                         |
| <b>EFSA</b>                           | : Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu                                       |
| <b>ELISA</b>                          | :Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay                                   |
| <b>FAO</b>                            | :Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü                            |
| <b>FDA</b>                            | : Gıda ve İlaç Dairesi                                               |
| <b>FSH</b>                            | :Folikül Uyarıcı Hormon                                              |
| <b>GSH</b>                            | : Redükte Glutasyon                                                  |
| <b>HCHO</b>                           | :Formaldehit                                                         |
| <b>HDL</b>                            | :Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein                                       |
| <b>HMF</b>                            | : 5-Hidroksimetil Furfural                                           |
| <b>IARC</b>                           | :Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi                               |
| <b>İNÜTF-DEHÜM</b>                    | :İnönü Üniv. Tıp Fak Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma<br>Merkezi |
| <b>LDL</b>                            | :Düşük Yoğunluklu Lipoprotein                                        |
| <b>LH</b>                             | :Lüteinleştirici Hormon                                              |

|                        |                                                                              |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LOAEL</b>           | :Gözlenebilir Bir Yan Etki Oluşturan En Düşük Düzey                          |
| <b>NOAEL</b>           | :Gözlenebilir Bir Yan Etki Oluşturmayan En Yüksek Düzey                      |
| <b>PST</b>             | : Peynir Altı Suyu Tozu                                                      |
| <b>R<sub>2</sub>NH</b> | :Aminler                                                                     |
| <b>RCHO</b>            | :Aldehitler                                                                  |
| <b>RNA</b>             | : Ribonükleik Asit                                                           |
| <b>ROS</b>             | : Reaktif Oksijen Türleri                                                    |
| <b>RSH</b>             | :Tiyoller                                                                    |
| <b>RT-PCR</b>          | : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                 |
| <b>SNF</b>             | :İsveç Ulusal Gıda İdaresi                                                   |
| <b>TÜBİTAK</b>         | : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu                            |
| <b>TÜBİTAK-MAM</b>     | :Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu Marmara<br>Araştırma Merkezi |
| <b>U.S. FDA</b>        | : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi                                              |
| <b>WHO</b>             | : Dünya Sağlık Örgütü                                                        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b>Şekil No</b>                                                                                                      | <b>Sayfa No</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Şekil 2.1. AKR'nin kimyasal yapısı .....                                                                             | 11              |
| Şekil 2.2. Maillard Reaksiyonu ve AKR Oluşumu .....                                                                  | 11              |
| Şekil 2.3. Farklı moleküllerden AKR oluşum yolları.....                                                              | 12              |
| Şekil 2.4. E vitamininin kimyasal yapısı .....                                                                       | 23              |
| Şekil 4.1. Her bir gruba ait testis dokularından saflaştırılan RNA'ların<br>elektroforegramı .....                   | 34              |
| Şekil 4.2. $\beta$ -aktin ve Aromataz mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR<br>ile çoğaltım eğrisi. ....       | 35              |
| Şekil 4.3. $\beta$ -aktin ve Aromataz mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR<br>ile total çoğaltım eğrisi. .... | 35              |
| Şekil 4.4. $\beta$ -aktin ve Aromataz cDNA'larının RT-PCR'daki çoğaltımının<br>elektroforegram görüntüsü. ....       | 36              |
| Şekil 4.5. Grupların testis ve karaciğer aromatazına ait protein bandları ve<br>aromataz/beta aktin oranları. ....   | 37              |
| Şekil 4.6. Kontrol grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.....                                             | 39              |
| Şekil 4.7. Kontrol grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.....                                             | 39              |
| Şekil 4.8. AKR grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.....                                                 | 40              |
| Şekil 4.9. AKR grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.....                                                 | 40              |
| Şekil 4.10. E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. ....                                        | 41              |
| Şekil 4.11. E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü .....                                        | 41              |
| Şekil 4.12. AKR + E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.....                                   | 42              |
| Şekil 4.13. AKR + E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.....                                   | 42              |

## TABLÖLAR DİZİNİ

| <b><u>TabloNo</u></b>                                                                           | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>Tablo 2.1.</b> Amerikada sıklıkla tüketilen bazı besinlerde tespit edilen AKR miktarları .   | 14                     |
| <b>Tablo 2.2.</b> Türkiyede sıklıkla tüketilen bazı besinlerde tespit edilen AKR düzeyleri .... | 15                     |
| <b>Tablo 2.3.</b> Çeşitli gıdaların E vitamini içeriği.....                                     | 25                     |
| <b>Tablo 3.1.</b> Aromataz ve $\beta$ -Aktin Primerlerinin Dizilimleri.....                     | 30                     |
| <b>Tablo 4.1.</b> Gruplarının testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat ağırlıkları .....  | 33                     |
| <b>Tablo 4.2.</b> Gruplarının spermiyogram sonuçları .....                                      | 34                     |
| <b>Tablo 4.3.</b> Gruplarda hesaplanan testis aromataz/ $\beta$ -aktin mRNA oranı .....         | 36                     |
| <b>Tablo 4.4.</b> Grupların Testosteron, Östradiol, FSH ve LH sonuçları .....                   | 38                     |

# 1. GİRİŞ

Akrilamidin(AKR) üreme sistemi üzerinde meydana getirdiği toksik etkileri araştırmak üzere, yetişkin gebelik (gestasyonel) ve/veya süt emzirme (laktasyonel) süresince AKR uygulanarak yapılan çok sayıda deneysel araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmaların sonuçları, gebelik ve/veya laktasyon süresince AKR uygulamasının testis dokusunu hasarlandırıldığını ve fonksiyonlarını önemli derecede bozduğunu ortaya koymuştur. Ancak literatür taramasında, gebelikle başlayan laktasyonla devam eden ve erkek sıçanların cinsel olgunluğa eriştiği postnatal 8. haftaya kadar AKR uygulanarak yapılmış bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Yapılan araştırmalar AKR'in, testislerde oksidatif stres ve oksidatif doku hasarına yol açtığını, testisin Leydig hücrelerinde testosteron sentezini sağlayan bazı enzimlerin (3-beta hidroksisiteroid dehidrojenaz, 17-OH steroid dehidrojenaz gibi) protein düzeylerini ve aktivitelerini azaltarak testosteron sentezini azalttığını, testosteron sentezinin azalmasına bağlı olarak spermatogenezi bozduğu ve serum testosteron düzeylerini önemli oranda düşürdüğünü ortaya koymuştur.

Aromataz, başta yağ doku olmak üzere testisler, kas, deri, karaciğer dokularında da bulunmakta ve testosteronu östradiole, testosteronun öncül molekülü olan androstenodionu da östrona dönüştüren önemli bir enzimdir. Yetişkin ratlarda aromataz, büyük oranda testisin Leydig ve spermatogonyum hücrelerinde lokalizedir ve düşük düzeylerde de olsa testosteronu östradiole düşürerek östradiolün testislerin normal fizyolojik fonksiyonlarına önemli katkılar yapmasını sağlar. Gerek insanlar ve gerekse de deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar, testislerde aromataz aktivitesinin azalmasının östradiol sentezinin azalmasına bağlı olarak testis fonksiyonlarını bozduğunu, sperm hareketliliğini önemli oranda azalttığını, aromataz aktivitesinin artmasının ise testosteronun östradiole dönüşüm hızının artması ile ve/veya testosteronun öncül molekülü olan androstenodionun östrona dönüşmesi ile testislerde ve serumda testosteron düzeylerinin önemli derecede düştüğünü, testis fonksiyonlarının bozulduğunu ve spermatogenezin baskılandığını göstermektedir. Literatürde AKR uygulamasının testislerde aromataz aktivitesine etki/etkileri konusunda yapılmış herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, gebelik süresince, laktasyon döneminde ve postnatal 8. haftaya kadar AKR uygulanmış erkek ratlarda AKR uygulamasının testislerde aromataz aktivitesini değiştirip değiştirmediği, aromataz aktivitesinde değişiklik meydana getirmiş ise bu değişikliğin hangi yönde olduğu tespit edilecek ve AKR uygulamasının testislerde meydana getirdiği tüm toksik etkiler histopatolojik, biyokimyasal ve spermiyogram analizleri yapılarak ortaya konulacaktır. Ayrıca gebelik süresince, laktasyon döneminde ve postnatal 8. haftaya kadar E vitamini uygulamasının AKR kaynaklı bu toksik etki/etkileri ne derece engelleyebileceği de araştırılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC 1994) (AKR)'yi 2A Grubu, insanlar için olası kanserojen olarak listesine almıştır. Bu olay, AKR'nin bilim dünyasının gündemine gelmesini sağlamış ve konuyla ilgili araştırmaların yapılmasına temel teşkil etmiştir. Ancak, 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda İdaresi (SNFA) ve Stockholm Üniversitesinin ortaklaşa yaptıkları araştırmada gıdaların kızartılarak ve fırınlanarak hazırlanması sırasında bol miktarda AKR oluştuğunun tespit edilmiştir. Bu durum AKR ile ilgili araştırmalar için dönüm noktası olmuştur. 2002'deki bu veri, gıda kaynaklı AKR'nin deney hayvanları ve insanlarda meydana getireceği muhtemel toksik etkileri ile ilgili araştırmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. AKR, endüstrinin çok farklı alanlarında kullanılan bir kimyasaldır. O tarihlerde yapılan araştırmalar, AKR'nin hayvanlarda nörotoksisiteye ve karsinogeneze neden olduğunu ortaya koymuştur. Gıdaların 120°C'den yüksek sıcaklıklarda işlenmesi sırasında bol miktarda AKR oluşmaktadır. AKR içeren gıdaları tüketen insanlar ve hayvanlar AKR'ye maruz kalmaktadırlar.

AKR günlük hayatta kullanılan çok farklı ürünlerde, monomerik ve polimerik (poliakrilamid) olmak üzere 2 farklı formda bulunabilmektedir. İnsanlığın var oluşundan beri gıdalar, muhafaza ve lezzetlendirilme amacı ile ısıtılma işlemlerine tabi tutulmuştur. Ancak günümüzde yapılan araştırmalar, ısıtılma işleminin faydalı etkilerinin yanında, insan sağlığı için zararlı olabilen kimyasal maddelerin meydana gelmesinde sağlayabildiğini göstermiştir (1). AKR, 120°C'den yüksek sıcaklıklarda işlenen gıdalarda kendiliğinden oluşmaktadır. Özellikle patates gibi yoğun karbonhidrat içeren gıdaların kızartılması bol miktarda AKR oluşturması nedeni ile bu tür gıdaların tüketilmesi insan sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda hazırlanan gıdalarda, Maillard reaksiyonu ile AKR'nin monomerik formu oluşmaktadır. AKR'nin monomerik formu insanlar için yüksek derecede nörotoksiktir. Aynı zamanda monomerik AKR, laboratuvar hayvanlarında karsinogeneze yol açmaktadır. Bu nedenle Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) AKR'yi 1994 yılında "insanlar için muhtemel kanserojen" (Grup 2A) olarak sınıflandırmıştır.

AKR'nin polimerik formunun toksisitesi monomerik forma göre oldukça düşüktür. Ancak, AKR'nin polimerik formunun gıdalara katılmasında insanlar için zararlıdır. Tarihte AKR'nin zararlı etkileri ilk defa, 1997 yılında Hollandsas 2 tünelinin

işası sırasında içme sularına AKR karışmasıyla ortaya çıkmıştır. Bu bölgede yaşayan ineklerde genel olarak yürüme ve ayakta durma problemlerinin, yoğun balık ölümlerinin ve tünel işçilerinde el ve ayaklarında yaygın uyuşmanın görülmesi, uzmanları konuyu araştırmaya yönlendirmiştir (2). Yapılan araştırmalar, bu bölgedeki hayvan ve insanların kanında yüksek oranda AKR bulunduğunu ve yaşanan problemlerin nedeninin içme suyu ile maruz kalınan AKR toksisitesinden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bu olaydan sonra insanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, içme suyu ya da mesleki olarak AKR'ye maruz kalmamış insanların da kanında yüksek düzeyde AKR'ye rastlanması, araştırmacıları AKR maruziyet kaynaklarını araştırmaya yönlendirmiştir(3).

24 Nisan 2002'de, İsveç Ulusal Gıda Kurumu ve Stockholm Üniversitesi araştırmacılarının, 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hazırlanan gıdalarda bol miktarda AKR oluştuğunun tespit edilmesi, bu konuda önemli bir dönüm noktası olmuştur ve bilim insanlarının dikkatini AKR toksisitesi üzerine yoğunlaştırmıştır (4). AKR plasentayı geçerek fetusun intrauterin gelişimi üzerinde malformasyon ve hasarlara, anne sütüne doğrudan geçerek laktasyon süresince yavruların postnatal gelişimi üzerinde gerileme ve toksikasyonlara neden olabilmektedir (5).

Gebe kadınların AKR içeren gıdaları tüketmesi ile AKR'ye maruz kalmakta ve muhtemelen bu AKR maruziyeti fetuslarında etkilemektedir. Geçmişten bu güne kadar AKR konusunda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar, gıdalarda AKR oluşum mekanizması ve AKR oluşumunun azaltılması, AKR'nin insan ve hayvanlarda meydana getirdiği toksikasyonlar konularında ciddi veriler ortaya koymuştur. Bununla birlikte, AKR'nin insan ve hayvan sağlığında meydana getirdiği hasarlar tam olarak bilinmemektedir (6-9). Ulusal gıda güvenliği kurumları, insanların günlük olarak maruz kaldığı AKR miktarlarını kg başına 0.3-0.8 µg/gün olarak bildirmişlerdir. Çocuklardaki günlük AKR alım miktarının yetişkinlere göre 1.5 kat daha yüksek olabileceği iddia edilmiştir (10).

AKR macun, boya, kontak lens üretiminde, kozmetik, jel elektroforezi, baraj, tünel ve kanalizasyonların yapımında, su arıtma işlemlerinde ve diğer pek çok endüstriyel işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsanlar günlük hayatlarında bu kaynaklardan AKR'ye maruz kalmaktadır. Ancak, insanlar tarafından günlük yaygın olarak tüketilen gıdalarda yoğun miktarda AKR varlığına rastlanması, bilim camiasında ciddi bir endişeye sebep olmuştur. Bu tarihten sonra, gıda kaynaklı AKR maruziyetinin

insan ve hayvan sağlığı üzerine meydana getireceği muhtemel toksik etkileri ortaya çıkartmak için çok sayıda araştırma yapılmıştır (11-13).

Ayrıca AKR, yüksek sıcaklıklarda pişirilmiş karbonhidrat bakımından zengin gıdalarda ve tütün dumanında da bulunur. AKR, polimerlerin suda çözünürlüğünü, yapışmasını ve çapraz bağlanması artıran bir vinil monomerdur. Araştırmalar, AKR'nin sinir, üreme, iskelet kassistemi üzerindeki toksik etkiler meydana getirdiği ortaya koymuştur. AKR'nin bu toksisitesi, içinde bulunan proteinleri / enzimleri etkisiz hale getirebilen proteinler üzerindeki sülfhidril gruplarına olan afinitesi ile ilgilidir. Ayrıca, AKR'nin kendisi ve aynı zamanda sitokrom P450 sisteminde oluşturulan AKR metabolitlerinin de hücresel toksisitede rol oynadığı grlmektedir. Yapılan deneysel araştırmalarda, AKR uygulanan sıçanların testislerinde, seminifer tübülleri saran epitel hücrelerinde, Leydig hücrelerinde dejenerasyonu ve nekroz meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, AKR oosit kalitesini ve sayısını, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırarak ve oositte apoptozisi uyarak etkiler.

AKR'nin esas zararlı etki/etkilerinin mekanizmasının, hücre hasarı veya ölümün yanı sıra DNA ve proteinler gibi kritik makro moleküllerde meydana getirdiği oksidatif stres hasarıdır. AKR'ye maruz kalan deney hayvanlarında üreme sisteminin yapısal ve fonksiyonel olarak ciddi derecede etkilendiği, testis fonksiyonlarının bozulduğu, sperm sayılarının ve sperm hareketliliğinin azaldığı, spermelerde morfolojik yapının bozulduğu ve üreme sisteminde meydana gelen bu patolojilere bağlı olarak dişilerin gebe kalma oranlarının, bir batında doğan yavru sayılarının ve ağırlıklarının önemli derecede bozulduğu rapor edilmiştir. Bu veriler AKR'nin üreme sistemi için oldukça toksik bir kimyasal olduğunu göstermektedir. Erkek reme sisteminin en önemli organları olan testis, genetik, hormonal ve çevresel etkilere karşı oldukça hassastır. Yapılan araştırmalar, AKR'nin testis hücrelerinde meydana getirdiği hücre iskeleti (sitoskeleton) hasarının, Leydig hücrelerine kolesterol alımının azalmasına ve buna bağlı olarak testosteron sentezinin ve serum testosteron düzeyinin düşmesine neden olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, testosteron sentezinin ve serum testosteron düzeylerinin düşmesini takiben testislerde yoğun miktarda apoptotik hücre oluşumu, spermatojenik hücrelerde parçalanma, Leydig hücrelerinin canlılığında azalma ve histopatolojik değişikliklerin eşlik ettiği rapor edilmiştir.

AKR'nin gıdalarda bulunma düzeyleri ile ilgili mevcut yasal bir limiti bulunmamakla birlikte Avrupa lkelerinde yetkili merciler tarafından gıdalardaki AKR

düzeyleri sürekli ve düzenli olarak kontrol edilmektedir. Sağlık kuruluşları, insan sağlığı için güvenli kabul edilebilecek gıda kaynaklı AKR düzeyleri ile ilgili yoğun çalışmalar devam etmektedir. Muhtemelen yakın gelecekte, gıdalarda bulunan AKR'nin insan sağlığı açısından güvenli kabul edilebilecek limitlerin belirlenmesi konusunda bir karar ve konsensüse varılacaktır. Dünya sağlık otoriteleri üretici firmalardan ürünlerindeki AKR miktarını düşürmeye yönelik tedbirler alınmasını ve yeni üretim teknolojiler geliştirmesini istemektedir. 2007-2010 yıllarında Avrupa Gıda Güvenliği Kurumunun gıdalardaki AKR düzeyleri ile ilgili olarak yaptığı taramalarda, çok az sayıda gıdada AKR düzeylerinin azaldığı tespit etmiştir. Bazı besin gruplarında (kahve, kahve yerine geçen maddeler ve krakerler) ise AKR düzeylerinin arttığı saptanmıştır (14). EFSA'nın gıdalardaki AKR düzeyleri konusunda yaptığı tarama sonuçları, gıda üreten firmaların gıdalarda AKR oluşumunu azaltmaya yönelik aldığı tedbirlerin ve uyguladıkları teknolojilerin istenen verimliliğe ulaşmadığını göstermektedir.

İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda AKR nörotoksik genotoksik, karsinogenik ve üreme sistemi üzerine toksik etki/etkiler meydana getirdiği gözlemlenmiştir (15).

Bilim insanları AKR'nin karsinogenik etkisinin, birçok gıda kaynaklı kanserojenlerden daha düşük olduğunu bildirmişler, ancak AKR'in gıdalarda daha yüksek düzeylerde bulunuyor ve günlük olarak sürekli alınıyor olması bilim camiasını kaygılandırmaktadır (11). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), AKR'in insanlarda sinir ve üreme sisteminde toksikasyon meydana getirebilmesi için, günlük maruz kalınan AKR düzeyinin en az 500 katından fazla miktarda alınması gerektiğini açıklamıştır. Bu açıklama, gıdalarda bulunan AKR düzeylerinin insanlar için zararsız olduğunu gösterebilir, deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları AKR'nin kümülatif bir etki ile toksikasyonlara ve kansere neden olabileceği endişesine neden olmuştur (16). AKR'in insanlarda kansere neden olduğu ile ilişkili henüz herhangi bir bilimsel kanıt bulunmasa da, IARC, AKR'yi insanlar için muhtemel kanserojen olarak ilan etmiştir (17).

2002 yılından bu yana gıdalarda AKR oluşumu ve düzeyleri, bilim insanları ve sanayi iş birliğiyle azaltılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla gıdaların hazırlanmasında AKR oluşumunu azaltma stratejileri: (1) AKR oluşumuna katılan öncü şeker ve amino asit içerikleri düşük ham maddelerin kullanılması,(2) üretim teknolojilerinin ve

yöntemlerinin yenilenmesi ve (3) üretim sonrası gıda ürünlerine bazı müdahalelerin yapılması olmak üzere 3 temel noktada toplanmaktadır (18,19).

E vitamini, hücre metabolizması sırasında oluşan serbest oksijen radikallerini süpürerek antioksidan etki gösterir. Oksidatif stresin neden olduğu oksidatif doku ve hücre hasarlarını engeller. E vitamini antikarsinojen ve nöroprotektiftir. Hücresel inflamasyonu ve adezyonları azaltır. E vitamini plasentayı kolaylıkla geçebilmekte ve yağda kolay çözünen (lipofilik) yapısından dolayı kan-beyin bariyerini de geçip fetal beyin dokusuna ulaşabilmektedir. Özellikle antioksidan kapasitenin düşük olduğu beyin dokusu gibi dokular için E vitamini güçlü bir hücre ve doku koruyucusu olan bir vitamindir.

Vitaminler günlük olarak az miktarlarda alınmalarına rağmen, vücudun fizyolojik fonksiyonları için kesinlikle gerekli olan moleküllerdir. Yağda çözünen bir vitamin olan E vitaminide hücrelerin normal fonksiyonları için kesinlikle gereklidir ve vücutta karaciğerde depolanmaktadır. E Vitamininin güçlü antioksidan etkilerine ilaveten zararlı kolesterol olarak bilinen LDL kolesterolünün oksidasyonunu önleyerek ateroskleroz temelli hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedir. E vitamini yetersizliği, gelir seviyesi düşük toplumlarda ve yetersiz beslenen insanlarda sık görülen bir durumdur. Vitamin E özellikle bağışıklığı sustürür, saç ve cilt sağlığını korur. Ayrıca antioksidan etkisinden dolayı çeşitli kanser türlerine karşı antikanserojen etki gösterir.

E Vitamini, 8 farklı kimyasal yapıdaki moleküllerden oluşan bir vitamindir. Tabiatla en yaygın bulunan formu alfa tokoferoldür. E vitamini önemli bir antioksidandır. Yağda çözünme özelliği ile E vitamini, hücrelerin yağ fazında depolanan ve vücudun özellikle serbest radikallerini detoksifiye ederek hücrelerin hasarlanmalarına karşı korur ve çeşitli kanser türlerine karşı antikanserojenik etki gösterir. Kasların yapı ve fonksiyonlarının devamına, eritrositlerin oluşumuna da katkı sağlar. Bununla birlikte A ve E vitaminlerinin, demir ve selenyum gibi minerallerin depolanmasını sağlar. Alzheimer gibi beyin hastalıklarının gelişiminin baskılanmasına, belirtilerini hafifletilmesine ve oluşacak hasarların azaltılmasına yardımcı olur. Hücrelerin yenilenmesini sağlar, yaraların iyileşmesini hızlandırır, cilt kanserine karşı korur ve yaşlanmayı geciktirir. Özellikle A ve E vitaminleri, selenyum hücrelerin yağ ve su fazlarında güçlü antioksidan etki gösteren ve vücudu oksidatif stres hasarlanmalarına karşı koruyan önemli moleküllerdir.

E vitaminin güçlü antioksidan ve nöroprotektif etki mekanizması, serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif stres durumunda, hücre membranı ve subselüler organel membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyon reaksiyonlarını baskılayarak zincir kıran bir etki oluşturması ve hücresel yapının stabilitesinin sağlanması esasına dayanır. E vitaminin hücrelerde proliferasyonu, inflamasyonu ve adezyonları baskılar.

E vitamini, fosfolipitlerin veya lipoproteinlerin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan peroksil radikallerini çok daha stabil olan lipid hidroperoksitlere dönüştürür. Böylece E vitamini lipid peroksidasyonunda zincir kırıcı etki oluşturur ve hücresel yapıları lipid peroksidasyonunun hasarlarından korur. E vitaminin lipid peroksidasyon zincirini kırarak güçlü antioksidan etkisi ortaya çıkar ve bu etki immun yanıtın güçlenerek artmasında sağlar. AKR'in üreme sistemi üzerindeki toksik etki/etkilerini ortaya koymaya ve E vitamininin bu etki/etkileri önleme ve/veya azaltmadaki potansiyel rolünü değerlendirmeye yönelik çok sayıda deneysel araştırma yapılmıştır. AKR'e maruz kalan sıçanların testis dokularında farklı toksik etkilerin meydana geldiği rapor edilmiştir. Bu toksik etkilerden bazıları, seminifer tübüllerde dejenerasyon, testis dokusunda apoptotik hücre artışı ve çeşitli derecelerde spermatogonyum dejenerasyonu sayılabilir. Yang ve ark. yaptıkları çalışmada AKR'ye maruz kalan sıçanlarda spermatojenik hücre sayısında azalma ve seminifer tübüllerin epitel hücrelerinin boyutlarında azalma meydana geldiğini gözlemlemişler ve AKR'in olası toksik etkilerine karşı koruyucu amaçla verilen E vitamininin, AKR kaynaklı oksidatif stresi ve oksidatif doku hasarını önemli derecede engelleyerek koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (20).

Hasanin ve ark. yaptığı çalışmalarında AKR'nin albino sıçan testislerinde dejeneratif değişikliklere ve spermatogenezin durmasına neden olduğunu tespit etmişler ve E vitamininin güçlü antioksidan ve antipoptotik etkileri nedeni ile testislerde AKR kaynaklı hücre ve doku hasarını önemli derecede engellediğini ortaya koymuşlardır (21).

Bizim bu çalışmamızda; gebelik boyunca, laktasyon süresince ve postnatal 8. haftaya kadar AKR'ye maruz kalan erkek yavru ratların testislerinde meydana gelen AKR kaynaklı hücresel ve dokusal hasarların, spermatogenezde meydana gelebilecek olan muhtemel fonksiyon bozukluklarının, bu hasarların/fonksiyon bozukluklarının

muhtemel mekanizmalarının araştırılması ve bu muhtemel hasar ve fonksiyon bozukluklarına karşı E vitamininin koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## **2.1. Fetusun Morfolojik Gelişimi**

İnsanda embriyogenez ve organogenez, sperm hücresinin yumurta hücresini döllemesi (fertilizasyon) sonrası meydana gelen zigotun oluşması ile başlar. Daha sonra zigot hızla bölünür ve çok hücreli bir yapı kazanır. Zigotun bölünmesi, büyümesi ve farklılaşması devam eder ve blastosite dönüşür. Blastositin endometriyuma tutunması ile embriyo oluşur ve embriyogenez başlar. Embriyo, daha sonra organların gelişimi ile fetusa dönüşür (22).

Gebeliğin ilk 3 ayında gerçekleşen embriyogenezde, embriyo hızlı bir büyüme ve olgunlaşma gösterir. Doku ve organların büyümesi ve olgunlaşması bu aşamada başlar. Gebeliğin 3. ayının başından doğuma kadar süren intrauterin döneme fetal dönem denir. Fetal dönemde fetusun bedensel olarak büyümesi ile birlikte, doku ve organlarda da büyüme, farklılaşma ve gelişim birlikte devam eder. (23).

Fetal dönem 3 evrede gerçekleşir. Birinci evre; gebeliğin ilk 18–20 haftasında gerçekleşir. Bu evre, hücrelerin hızlı mitoz bölünmesiyle çoğalması ve sayıca artışı ile karakterizedir. İkinci evre, gebeliğin yaklaşık 20–28 haftalarını kapsar. Bu evrede organlarda hiperplazi ve hipertrofi daha baskın olarak gerçekleşir. Üçüncü evre, gebeliğin 28. Haftasından doğuma kadar olan zamanı içerir. Bu evrede ise, hücre hacimlerinde ve bağ doku miktarlarında artış, kas kitlesinde genişleme söz konusudur. Fetus gelişimini etkileyen en önemli faktörler, genetik ve çevresel etkilere sahiptir. Genetik ve çevresel etkiler, fetal gelişimin yönünü belirleyici olabilmektedir. Fetal gelişimin sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için öncelikle gebelik haftasının doğru olarak tespit edilmiş olması gerekmektedir. Gebelik haftasının tayini, fetusun ultrason verileri, tepe-oturma noktası (CRL) değeri, fetal biyometrik ölçümlerin değeri dikkate alınarak yapılmaktadır (24). Bununla birlikte, fetusun yaş tayinindeki en önemli veri, fetusun ölçülen boyudur. Fetusun boyu, CRL ya da ayakta durma yüksekliğini veren tepe-topuk mesafeleri ölçülerek hesaplanır. Bu ölçümler, daha sonra hafta ve lunar ay olarak verilen fetusun yaşı ile karşılaştırılır (23).

Fetusun büyümesi için gerekli olan enerji, ihtiyaç duyulan maddelerin anne kanından placentaya aracılığı ile fetus dokularına geçmesi ile sağlanır. Fetusun büyümesini sağlamak üzere enerji üretimi için başlıca glukoz kullanılmakla birlikte,

aminoasitlerde fetusun büyümesi için gerekli olan moleküllerdir. Glukozun metabolize edilmesini sağlayan insülin hormonu fetusun pankreasında sentez edilerek salınmaktadır. İnsülin hormonun yanı sıra insan büyüme hormonu ve bazı küçük polipeptidlerde fetusun büyümesinde rol almaktadır (22).

## **2.2. Akrilamid**

### **2.2.1. Akrilamidin Kimyasal Yapısı ve Sentezi**

AKR 1893 yılında Alman araştırmacı Christian Moureau tarafından keşfedilmiştir. AKR Almanya’da 1950’li yıllarda ağırlıklı olarak ticari ve kimyasal faaliyetler için kullanılmaya başlanmıştır. AKR tekstil, kâğıt, kozmetik üretimi ve içme sularının iyileştirilmesi başta olmak üzere çok farklı endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanım imkanı bulmuştur. AKR kimyasal olarak sentezlenebilen yüksek toksisiteye sahip, doymamış çift bağ içeren bir amittir (25).

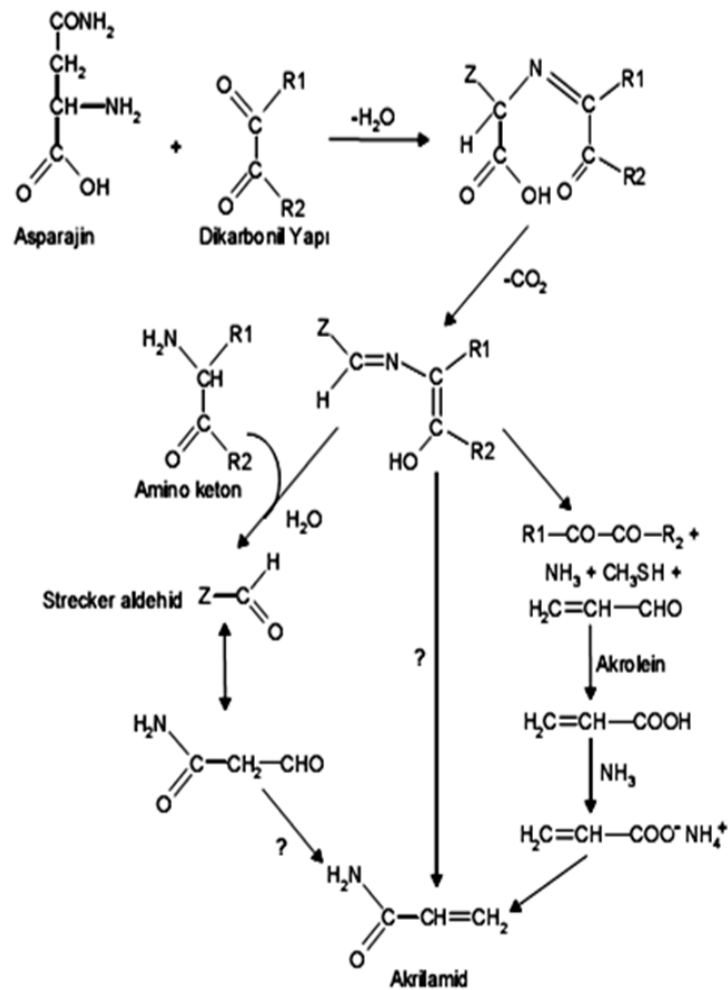
Yüksek moleküler ağırlıklı ve polimerik özellikli poliakrilamid, AKR ve bisakrilamid birimlerinin polimerizasyonu sonucu oluşmaktadır. Poliakrilamid, çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Bunların başlıcaları; matbaacılık alanında kâğıdın sağlamlılığını artırmada, atık suların arıtılması işleminin yoğunlaştırma aşamalarında, deodorant, parfüm gibi çeşitli kozmetik malzemelerin hazırlanma aşamalarında katkı maddesi olarak kullanılmasıdır. Bunun yanı sıra AKR, PAGE elektroforezi ve kromatografi gibi protein, DNA, RNA parçacıklarının ayırım ve saflaştırılması yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklık derecelerine maruz bırakarak hazırlanan besinlerde de AKR spontan olarak oluşmaktadır (26).

Yapılan araştırmalarda, gıdaların hazırlanması sırasında 120 °C’nin üzerindeki sıcaklıklara (özellikle kızartma ve fırınlama) maruz bırakılan besinlerde, sıcaklık derecesinin ve maruziyet süresinin artışı ile doğru orantılı bir şekilde AKR oluştuğu ortaya konulmuştur (27).

AKR, etilen karboksamid, propenoik asit amid, akrilik amid ve vinil amid olarak bilinen doymamış çift bağ içeren bir amittir. Oda sıcaklığında kokusuz, tatsız, katı halde bulunan AKR; sıvı fazda iken beyaz kristal görünümündedir ve yüksek derecede hidrofilik bir kimyasaldır. AKR 84.5°C’de çözünür ve 125.6°C’de ise kaynar. AKR’nin molekül kütlesi 71.08 g/mol dür ve aseton, metanol, etanol gibi polar çözücülerde de kolaylıkla çözünürken; polar olmayan çözücülerde çözünmez (28).

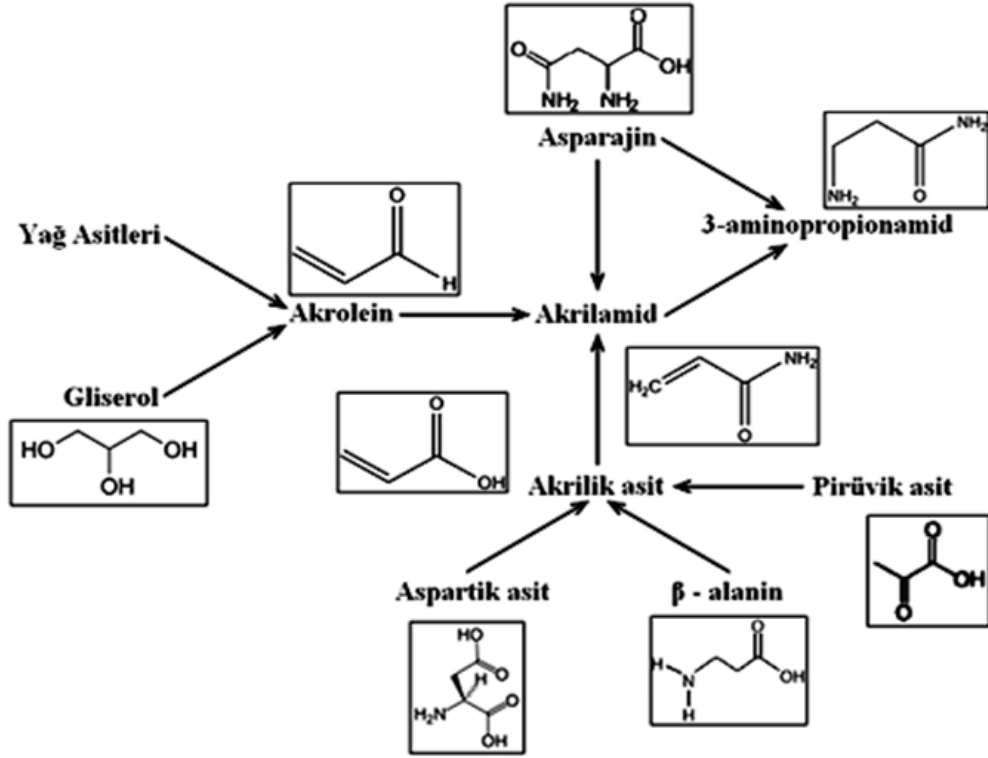
NC(=O)C=C

Gıdaların 120 °C'nin üstündeki sıcaklıklara maruziyeti sırasında, gıdaların içeriğinde bulunan özellikle glukoz, fruktoz ile asparajin arasında meydana gelen reaksiyonlar (Maillard reaksiyonu) ile AKR oluşmaktadır (30). Maillard reaksiyonu ve AKR oluşumu Şekil 2.2.'de verilmiştir.



11

AKR oluşumunun, asparajin yoluna ek farklı maddeler üzerinden de meydana gelebilmektedir. Asparajin yolu kadar etkili olmasa da akrilik asit, akroleinden de AKR oluşabilmektedir (29). Farklı moleküllerden AKR oluşum yolları Şekil 2.3.'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Farklı moleküllerden AKR oluşum yolları

### 2.2.2. Gıda Kaynaklı Akrilamidin Oluşumu

Gıda kaynaklı AKR oluşumunu etkileyen en önemli faktörler, besinlerin pişirilme süresi ve sıcaklık derecesidir. Besinlerin pişirilme süresi ile sıcaklık derecesi arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır. Aynı gıdanın farklı formları arasında ve farklı tarihlerde üretilmiş olanlarında bile AKR içeriği yönünden farklılıklar meydana gelmektedir. Gıdaların pişirilme şekilleride AKR oluşumunu etkilemektedir. Yapılan araştırmalarda haşlanarak pişirilen gıdalarda AKR oluşmadığı tespit edilmiştir (31). Bisküvilerin ve muhallebilerin hazırlanması esnasında süt, yağ ve şekerin yüksek sıcaklıkta pişirilmesi sonucu maillard reaksiyonu ile AKR oluşmaktadır. Bu ürünlerin uzun süre tüketilmesi insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bunun yanı sıra, yüksek sıcaklıkla muamele edilen süte, süt proteinlerinin yapılarının bozulmasına bağlı zararlı moleküller oluşabilir ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler meydana gelebilir (32).

Gıdaların hazırlanması sırasında oluşan AKR miktarı, gıdaların asparajin, glukoz ve içeriği, çeşidi, saklama şartları ve mevsimsel değişimlerden nemli oranda etkilenmektedir.

Bir çalışmada, gıdanın su miktarının ve pH'sının AKR oluşumunu etkilediği ve gıdanın içeriğinde maillard reaksiyonuna giremeyen asparajin dışı diğer aminoasitlerin bol miktarda bulunurluğunun AKR oluşumunu azalttığı ortaya konulmuştur (32).

Dünya genelindeki resmi kuruluşların çoğu, gıdaların ısıtılma işlemi sırasında AKR oluştuğunun kanıtlanması sonrasında, insan sağlığını etkileyebilecek bu durumu dikkate almıştır. Gıda kaynaklı AKR oluşumunu azaltmaya yönelik çok farklı yöntemlerin geliştirildiği araştırmalar yapılmıştır. Araştırma sonuçları, gıdaların üretim aşamalarında uygulanan iyileştirme önlemleri ile patates cipslerinin AKR içeriğinin % 30–40 oranında azaltılabileceğini göstermiştir. Fakat bu iyileştirici önlemlerin patates cipsi fabrikaları tarafından tam olarak uygulanıp uygulanmadığı ve uygulama sıklığı gibi konular belirsizliğini korumaktadır. Yaygın olarak kullanılan kahvaltılık gevrekler ve kahve için de benzer önerilerle, oluşan AKR miktarında azaltma sağlanabilmesi söz konusu olabilir. Yapılan çalışmalarda, AKR oluşum miktarının azaltılmasına yönelik çeşitli seçeneklerin bulunduğu ortaya konulmuştur (33).

Pişirme öncesinde gıdaya asparajinaz katarak asparajinin aspartata dönüştürülmesi sonucu AKR oluşumunun baskılanması en verimli yöntemlerden biridir; çünkü AKR oluşumunda asparajin temel rol almaktadır. AKR oluşumunu azaltmada en etkili yöntemin, gıdaların asparajin içeriğinin azaltılması olabileceğini düşündürmektedir. Gıdaların hazırlanması sırasında ortama Maillard reaksiyonu için asparajinle yarışan aminoasitlerin ilave edilmeside önerilen diğer bir yöntemdir. Gıdaların işlenmesi sırasında pişirme sıcaklığının azaltılması ve/veya pişirme süresinin kısaltılmasında AKR oluşum miktarının azaltılması için önerilen diğer yöntemlerdir.

### **2.2.3. Akrilamidin Gıdalarda Bulunuşu**

AKR'nin insanlar üzerinde toksik etkiler meydana getirebileceği dozlar kesin olarak bilinmemektedir. AKR'in de yer aldığı benzer kimyasal maddeler, çok düşük konsantrasyonlarda bile bir toksik etki gösterebilmekte ve bu grup kimyasallar için kesin olarak zararsız denmesi mümkün görünmemektedir.

120°C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerine maruz bırakılarak pişirilen gıdalarda yoğun miktarlarda AKR oluştuğunun rapor edildiği 2002 yılından sonra birçok kuruluş

kendi ülkelerindeki gıdalarda bulunan AKR düzeylerini ve sınır değerlerini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapmaya başlamıştır.

2002 yılından itibaren her yıl periyodik olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. FDA) piyasadan aldığı gıda numunelerinin AKR düzeylerinin ölçümünü yapmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi gıdaların AKR içeriklerini her yıl kendi kamuoyuna duyurmaktadır (34). Amerika’da sıklıkla tüketilen bazı besinlerin AKR içerikleri Tablo 2.1.’de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Amerikada sıklıkla tüketilen bazı besinlerde tespit edilen AKR miktarları

| Besin/ Besin ürünleri   | AKR düzeyi (µg/kg) |         |          |              |
|-------------------------|--------------------|---------|----------|--------------|
|                         | Ortalama           | Ortanca | Alt-üst  | Örnek sayısı |
| Patates cipsi           | 1312               | 1342    | 170-2287 | 38           |
| Patates kızartması      | 537                | 330     | <50-3500 | 39           |
| Hamur ürünleri          | 36                 | 36      | <30-42   | 2            |
| Fırınlanmış ürünler     | 112                | <50     | <50-450  | 19           |
| Bisküvi, kraker, tost   | 423                | 147     | <30-3200 | 58           |
| Kahvaltılık tahıllar    | 298                | 150     | <30-1346 | 29           |
| Mısır cipsi             | 218                | 167     | 34-416   | 7            |
| Sütlü ekmek             | 50                 | 30      | <30-162  | 41           |
| Balık ve deniz ürünleri | 35                 | 35      | 30-39    | 4            |
| Kümes hayvanları        | 52                 | 52      | 39-64    | 2            |
| İnstant malt içecekleri | 50                 | 50      | <50-70   | 3            |
| Çikolata tozu           | 75                 | 75      | <50-100  | 2            |
| Kahve tozu              | 200                | 200     | 170-230  | 3            |

TÜBİTAK-MAM tarafından yürütülmüş olan bir çalışmada, 9 ay boyunca piyasadan rastgele yöntemle ev yemekleri, kavrulmuş çerezler, ekmek ve fırıncılık mamulleri, cipsler, kahve, bisküvi, kraker, çikolata, bebek mamaları, patates kızartmaları, geleneksel Türk tatlıları, pekmez, ızgara, kebab, döner ve köfte gibi çeşitli gıdalardan örnekler alınarak bu gıdaların AKR düzeyleri analiz edilmiştir (35). TÜBİTAK-MAM tarafından yapılan çalışmanın sonuçları Tablo 2.2.’de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Türkiye’de sıklıkla tüketilen bazı besinlerde tespit edilen AKR düzeyleri

| Gıda maddesi           | AKR Düzeyi (µg/kg)          |
|------------------------|-----------------------------|
| Pirinç pilavı          | Ölçülebilir değerin altında |
| Tahin helvası          | Ölçülebilir değerin altında |
| Kebap, döner, ızgara   | Ölçülebilir değerin altında |
| Çavdar ekmeği          | Ölçülebilir değerin altında |
| Beyaz ekmek (kabukta)  | 40-160                      |
| Kızarmış ekmek (hazır) | 200                         |
| Hazır çorbalar         | 40-60                       |
| Tulumba tatlısı        | 40-45                       |
| Bebe bisküvisi         | 400-600                     |
| Bisküvi                | 70-130                      |
| Kraker                 | 70-200                      |
| Kahvaltılık gevrekler  | 80-350                      |

TÜBİTAK-MAM tarafından yapılan bu analiz sonuçları, fast-food ürünü olarak doğranıp dondurulmuş patatesten, evde taze patatesin soyularak kızartılmasına oranla çok daha yüksek miktarda AKR oluştuğunu ortaya koymuştur.

Bu araştırmada, tulumba tatlısı ve beyaz ekmeğin kabuğunda da önemli denilebilecek düzeyde AKR bulunduğu ortaya konulmasına rağmen; ekmeğin iç kısmında, ızgara, döner, tahin helvası, çavdar ekmeği, baklava ve pilavda ise AKR düzeyleri ölçülebilir değerlerin altında bulunmuştur. Cips, kraker, kahvaltılık gevrekler, bisküvi/bebe bisküvileri, patates ve ekmek kızartmalarında önemli miktarlarda AKR oluştuğu tespit edilmiştir. Besinlerin haşlanarak hazırlanması aşamalarında, gıda kaynaklı AKR oluşumunun meydana gelmediği rapor edilmiştir (36).

Elde edilen bu sonuçların doğrultusunda bilim insanları, çok yüksek düzeylerde AKR içeren gıdaların insan sağlığını önemli derecede tehdit eden bir durum olmasını göz önüne alarak, bu gıdaların üretiminin yasaklanması ya da bu gıdaların ambalajlarında “insan sağlığına zararlı AKR maddesi içerir” uyarı yazısının bulundurulması gerektiği yönünde ortak karara varmışlardır (37).

#### 2.2.4. Gıda Kaynaklı Akrilamid Oluşumunu Azaltma Yöntemleri

Günümüzde, insanların çoğunluğunun geleneksel yemek kültürü yerine daha çok kızartılmış ve fırınlanmış fast-food türü gıdalarla beslenmeye yönelmeleri nedeni ile, gıda kaynaklı AKR'e maruz kalmamaları hemen hemen mümkün değildir. Bu nedenle, AKR üzerinde yapılan araştırmaların yönü, gıdalarda AKR oluşumunu azaltmaya yönelik yöntem ve stratejiler geliştirmeye kaymış gibi görünmektedir. Gıdalarda AKR oluşumunu azaltma yöntem ve stratejileri geliştirmek amacı ile çok sayıda araştırma yapılmış ve yayımlanmıştır (18, 38-55).

Gıdalarda AKR oluşumunun azaltılmasına yönelik araştırmaların sonuçlarına göre, AKR oluşumunu azaltmaya yönelik yöntem ve stratejiler aşağıda özetlenmiştir.

- Ticari amaçla dondurulmuş patates ürünlerinden kaçınılması ve düşük nişasta içerikli patateslerin tüketilmesi,
- Patateslerin ılık/sıcak suda ya da oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra pişirilmesi/kızartılması,
- Patateslerin kızartılması öncesi, ılık/sıcak suda ya da oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra suyunun iyice alınması,
- Düşük pH'da AKR oluşumu % 20-30 oranında azalmaktadır. Patateslerin % 0.5-1.0 sitrik asit çözeltisinde 20 dakika kadar bekletilmesi,
- Patateslerin 8 °C'nin altındaki sıcaklıkta depolanması, patatesteki indirgen şeker oranını önemli derecede azaltır (Bazı kaynaklara göre 6 °C),
- Patateslerde altın sarısı rengin elde edilmesi için kullanılan glukoz/dekstroz çözeltisine daldırma işleminden kaçınılması,
- Gıdaların galetaya bulanarak pişirilmesi oluşan AKR düzeyini önemli oranda artırmaktadır. Bu işlemde vazgeçilmesi,
- Gıdaları başlangıç kızartma sıcaklığının 175 °C olmasına dikkat edilmeli ve sıcaklık kademeli olarak artırmamalıdır,
- Geleneksel fırınlarda pişirme sıcaklığının 200 °C'yi, fanlı fırınlarda 190 °C'yi geçmemesi,
- Gıdaların pişirme süresi/ısıısının patojenleri öldürecek en alt düzeye ayarlanması,

- Uygulanması ve pratikliği çok mümkün olmasada, patateslerin asparajin içeriğinin azaltılması,
- Araştırma sonuçları tam olarak teyit etmesede, asparajin-glukoz etkileşimini baskılamak için asparajinaz enziminin kullanılması,
- Tahıl mamüllerine amonyum bikarbonat yerine sodyum hidrojen karbonatın katılması.
- Patateslerin önce haşlanması ve sonra kızartılması glukoz ve asparajin düzeylerini azaltarak AKR oluşumunu düşürür.

### 2.3. Akrilamidin Toksik Etkileri

Yapılan çalışmalar, AKR insan ve hayvan sinir sisteminde nörotoksik etkilere neden olduğu ve belli dozların üzerine çıkıldığında ise hayvanlarda çeşitli kanserlerin oluşumunu indüklediğini ortaya koymuştur. Kemirgenler üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları, AKR'nin gıda kaynaklı diğer kanserojen ajanlarla benzer etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla beraber gıda kaynaklı kanserojen ajanların insanlar üzerinde meydana getireceği etkiler tamam olarak bilinmemektedir. Diyetle bulunan AKR düzeyinin, gıdaların pişirilmesi sırasında oluşan diğer kimyasallara göre daha yüksek düzeylerde olması nedeni ile AKR'nin kansere yol açabileceği yönündeki şüpheleri önemli ölçüde artmış ve AKR'nin toksik etkileri üzerinde yapılan araştırmaların bu noktada yoğunlaşmasına neden olmuştur (56).

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda monomerik yapıda olan AKR'nin sinir sistemindeki nöronal hücrelerde ve reproduktif sistemdeki üreme hücrelerinde hücre hasara yol açtığı ve özellikle hormonal duyarlılığı olan dokularda tümör gelişimini indüklediği tespit edilmiştir. İnsanlarda yapılan epidemiyolojik araştırmalarda, yüksek oranda AKR içeren gıdaları sürekli ve yoğun olarak tüketen toplumlarda nörotoksik etkilerinin belirgin derecede yaygın olmasına rağmen kanser riski için böyle bir yaygınlıktan bahsetmenin şu anki bilimsel verilerin ışığında mümkün olmadığı rapor edilmiştir (57).

Gıdalarla ve gıda dışı kaynaklardan vücuda alınan AKR'nin insan sağlığı üzerinde meydana getirdiği başlıca etkilerin, toksik ve karsinojenik etkiler olduğu bildirilmiştir (58, 59). Bir konjuge vinil bileşiği olan AKR biyolojik materyallere karşı reaktiftir ve yapısındaki çift bağdan dolayı amino (-NH<sub>2</sub>) ve sülfhidril (-SH) gruplarıyla

bağ kurmaya yatkınlık göstermektedir. İnsanlarda vücuda alınan AKR, gastro intestinal dokuların redükte glutatyon(GSH) düzeyleri yeterli ise AKR-glutatyon formuna dönüştürülerek etkisiz hale getirilmekte ya da Cyp2e1Sitokrom P450 2E1 enzim sistemi aracılığıyla oksitlenerek çok daha toksik olan glisidamide metabolize edilmektedir (38). Epoksi halkası içeren glisidamid hemoglobin gibi birçok biyomolekülle kolayca reaksiyona girebilmektedir. Glisidamidin DNA alkilasyonuna neden olması dokularda genotoksik etkilerin meydana gelmesinden sorumlu tutulmaktadır (60,61). AKR'ye maruz kalan kemirgenlerde tümör oluşumunun gözlenmesi AKR'nin insanlar üzerinde de kanser yapıcı etkisinin olabileceğini düşündürmüştür (62). Ayrıca, AKR kimyasalının insan ve hayvanların sinir sistemi ve kemirgenlerin erkek üreme organları üzerinde toksik etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır (63).

### **2.3.1. Akrilamidin Nörotoksik Etkisi**

AKR'nin nörotoksik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, nörotoksik etkiler açısından AKR'nin hayvanlarda gözlemlenebilir bir yan etki oluşturmeyen en yüksek düzeyinin(NOEL) ve gözlemlenebilir en düşük yan etki seviyesinin(NOEL) sırasıyla 0.2-0.5 ve 2 mg/vücut ağırlığı/gün olduğunu ortaya koymuştur (64).İnsanların diyetle aldığı AKR miktarının (0.001 mg/kg vücut ağırlığı/gün) nörotoksisite açısından güvenli olduğu düşünülse dahi bazı uzmanlar bu dozlardaki AKR'ye uzun süreli maruz kalınmanın oluşturabileceği kümülatif etkilerden dolayı tehlikeli olabileceğini ifade etmişlerdir (64).

AKR'nin nörotoksik etkileri öncelikle mesleki olarak bu kimyasala maruz kalan çalışanlarda görülmüştür. AKR içeren derz maddesini uygulayan inşaat işçileri el ve ayaklarındaki karıncalanmalardan ve uyuşmalardan şikayet etmeye başlamışlardır. Daha uzun süreli maruziyetler de ise kişilerde aşırı yorgunluk, ataksi ve periferik nöropati meydana gelmiştir (63).

AKR kaynaklı nörotoksisitenin altında yatan mekanizmayı anlamak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Öne sürülen temel hipotezler AKR'nin kinezin isimli motor proteinlerine bağlanarak sinir aksonları arasındaki hızlı sinyal iletimini baskılaması veya sistein aminoasitlerinde bulunan sülfidril gruplarına bağlanarak sinir uçlarındaki membran füzyonuna engel olması şeklinde açıklanmıştır (65).

### **2.3.2. Akrilamidin Kanserojen Etkisi**

Sıklıkla tükettiğimiz gıdalarda AKR'ye rastlanmasının ardından yapılan epidemiyolojik çalışmalarla AKR'in çeşitli kanser türleriyle olan ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmaların birçoğunda diyetle alınan AKR ile çeşitli kanser türleri arasında istatistiksel olarak önemli bir bağlantı bulunamamıştır. Ancak birkaç çalışmada diyetset AKR'ye maruz kalınmasıyla böbrek, rahim ve yumurtalık kanseri riskinin arttığı raporlanmıştır (66).

İşçiler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise AKR'ye maruz kalan çalışanlarda kansere yakalanma riskinde tutarlı bir artış saptanmamıştır. Çeşitli yollarla AKR'ye maruz kalan fare ve sıçanların bazı organlarında tümör oluşumu meydana geldiği gözlenmiştir. Bir çalışmada AKR eklenen suyu tüketen sıçanlarda testis mezotelyomasının, tiroid, beyin ve meme bezi tümörlerinin oluştuğu tespit edilmiştir. Hayvanlarda AKR kaynaklı kanser oluşum mekanizmasının ne olduğu konusu belirsizliğini koruyor olsa da, in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda genotoksik mekanizmanın ve hormonal değişikliklerin bu durumu tetiklediği düşünülmektedir (67).

### **2.3.3. Akrilamidin Genotoksik Etkisi**

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, farklı dokularda AKR kaynaklı karsinogenezin görülmesinden sonra, AKR'nin karsinogenik etki mekanizmalarını araştırmak çok önemli bir konu haline gelmiştir. In vitro ve in vivo çalışmalar, AKR ve metaboliti olan glisidamidin somatik ve üreme hücreleri üzerinde genotoksik etkiler meydana getirebildiğini göstermiştir (68). Reaktif bileşikler olan glisidamid ve AKR, DNA ya da diğer biyolojik moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmektedir. AKR'nin kardeş kromatitler arası değişimleri, mikronukleus oluşumlarını ve yapısal kromozomal sapmalarını indükleyerek kromozom yapısında değişikliğe neden olabildiği tespit edilmiştir. Öte yandan, AKR'nin genotoksik mekanizması tam olarak net değildir çünkü bu madde proteinlere bağlanmak ya da hormonal dengeyi bozmak gibi direkt olmayan genotoksik etki mekanizmalarına da sahiptir (69).

### **2.3.4. Akrilamidin Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri**

Üreme toksisitesiyle ilgili bir çalışmada, 7 mg/kg/gün dozda AKR ağız yoluyla erkek ve dişi ratlara verilmiş ve araştırmanın sonunda sperm sayılarının azaldığı, testis morfolojisinde değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir. Dişi ratlarda ise, üreme

sistemi üzerinde olumsuz bir etki gözlenmemiştir. Gelişimsel etkiler açısından, yüksek dozlarda alınan AKR'nin kemirgenlerde fetotoksik etkiler oluşturduğu görülmüştür. Üreme ve gelişmede olumsuz etkiye sebep olmayan doz (NOAEL) ise 2mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (69).

AKR'nin üreme sisteminde meydana getirdiği başka toksik etkileride bulunmaktadır. Farede sperm sayısında azalmaya ve anormal sperm morfolojisinde artışa neden olmakta (70), vakuolleşme ve yuvarlak spermatidlerin şişmesi gibi bozukluklara yol açmaktadır (71). Spesifik germ hücresi evrelerinde DNA hasarına yol açmaktadır (72). AKR'nin verilen sıçanlarda testosteron konsantrasyonu ve Leydig hücre sayısı düşmektedir (73). Sperm bozukluklarına yol açtığı ve testiküler hücreleri apoptosise götürdüğü gözlemlenmiştir. Seminifer tübüllerde çok sayıda çekirdekli dev hücreler ve vakuolleşme görülmektedir. AKR verilen erkek farelerde çiftleşmede, verimlilikte ve hatta spermilerin uterus içerisine transportunda ciddi azalmalar olmaktadır (74). Ayrıca, Gassner ve Adler 1996'da AKR'nin spermatositte hücre döngüsünün gecikmesine yol açtığını bildirdiler (75). AKR'nin farelerin ve sıçanların spermatidlerinde mutasyonlara neden olduğu rapor edilmiştir. Bundan dolayı, AKR'nin memeli üreme hücresi için mutajen olduğu düşünülmektedir (75-77). AKR birçok çalışmada testis ağırlığında ve hayvanın vücut ağırlığında azalmaya neden olmuştur (78, 79). Bazılarında sadece hayvanın tüm ağırlığında azalma varken rölatif testis ağırlığında bir değişiklik yapmamıştır (78, 80).

### **2.3.5.Akrilamidin Fetus Gelişimi Üzerindeki Toksik Etkileri**

Son yapılan araştırmalarda, AKR'nin fetusta yol açtığı hasarları; morfolojik, biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiş ve AKR'nin doza bağımlı olarak uygulanmasının fetusta ciddi morfolojik, biyokimyasal ve histolojik anormalliklere yol açtığını ortaya konulmuştur (81-83).

Allam ve ark. gebe ratlara gebeliğin 7. gününden doğuma kadar ve postpartum laktasyon süresi boyunca oral yolla günlük 10 mg/kg vücut ağırlığı dozunda AKR uygulayarak yaptıkları araştırmada, AKR'nin yavru ratlarda meydana getirdiği morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri incelemişlerdir. Bu araştırmada AKR'nin, fetal beyin dokusunda granuler tabaka proliferasyonunda ve nöronal hücreler farklılaşmada baskılanmaya, Purkinje hücrelerinde dejenerasyon ve kayıplara neden olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, prenatal ve perinatal dönemde AKR

maruziyetinin oksidatif strese yol açarak biyokimyasal antioksidan mekanizmalarda bozulmalara ve ratların beyin gelişiminde önemli ölçüde baskılanmaya neden olduğunu vurgulanmıştır (81).

El-Sayyad ve ark. yaptığı araştırmada, gebe farelere gebelik sırasında 25 mg/kg/gün dozda AKR oral yolla ve bir grubu % 33'ü kızartılmış patates cipsinden oluşan AKR'den zengin yemle besleyerek ve diğer bir grubada içme suyu ile 25 µg/kg dozda AKR uygulayarak yürüttüğü çalışmada, gebeliğin 14., 16. ve 17. gün ve postpartum fetuslar morfolojik ve histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. AKR ve kızartılmış patates cipsi uygulamasının fetal vücut ağırlığında ve boyutunda, tepe-oturma mesafesinde azalmalara (intrauterin gelişme geriliğine), kemiklerin gelişiminde geriliğe, spontan abortlara ve ölü doğumlara yol açtığı tespit edilmiştir. Hem prenatal hem de postnatal kızartılmış patates cipsi uygulanan grupta longitudinal vücut kemiklerinin oluşmadığını ancak içme suyu ile AKR uygulanan grupta böyle bir etkinin gözlemlenmediğini bildirmişler. Bu çalışmanın sonuçları, gebelik döneminde patates kızartmasından zengin diyetle beslenilmesinin gelişmekte olan fetusun sağlığını önemli ölçüde olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir (82).

Ogawa ve ark. ratlara gebeliğin 10. gününden 21. güne kadar 0, 4, 20 ve 100 ppm dozlarda AKR'yi içme suyu ile uyguladıkları çalışmada, annenin farklı dozlarda AKR maruziyetinin fetuslar üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 20 ve 100 ppm AKR uygulanan gruplarda yeni doğan ratların beyin dokusunun hipokampal bölge nöronlarında dejenerasyon, hücre kaybı gibi olumsuz etkilerin meydana geldiğini ve oluşan nörotoksisite ve gelişim bozukluğu ile maruz kalınan AKR'nin dozuna bağımlı olarak pozitif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir(83).

#### **2.4. E Vitamini**

1922 yılında Evans ve Bishop ratları ekşimiş yağ katılmış yemle besledikleri bir çalışmada, ratlarda fetal reabsorbsiyon gözlemlemiş ve bu olumsuz etkinin sebzelerde bulunan bir madde tarafından önlenemediğini tespit etmişler. Sebzelerde bulunan bu bilinmeyen madde 1924 yılında Sure tarafından E vitamini olarak adlandırılmıştır. Evans ve Bishop ratlara bu bileşiği diyetsetel olarak uyguladığında ratların üreme performanslarında belirgin ölçüde artış meydana gelmesi sebebi ile bu bileşiği (tokos = doğurmak, phero = taşımak ve bileşiğin bir alkol olması nedeniyle 'ol') 'tokoferol' olarak isimlendirmiştir(84). Bu bileşik ile ilgili yapılan sonraki araştırmalarda iki grup

daha bulunmuş, bunlara gama ve delta tokoferol adı verilmiştir (85). 1937 ve 1938 yıllarında alfa tokoferolün yapısı Erhard Fernholz tarafından keşfedildiği;  $\alpha$ -tokoferolün kimyasal olarak sentezlemesinin ise 1938'de Karrer ve ark. tarafından başarıldığı bildirilmiştir (86). E vitaminin biyolojik aktif şekline tokoferol denir. Doğal E vitamini olan D- $\alpha$ -tokoferolün molekül ağırlığı 430.69 g/mol, kaba formülü ise  $C_{29}H_{50}O_2$ dir. Doğal olan 8 tokoferol türü bulunmakta olup, bunlardan en aktif olanı  $\alpha$ -tokoferoldür. Plazmadaki E vitamininin %80-90 kısmını  $\alpha$ -tokoferol oluşturur ve dokudaki esas E vitamini şekli budur. Bunun nedeni  $\gamma$ -tokoferolün karaciğerde hızlıca yıkıma uğramasıdır. Bu sebeple araştırmalar  $\alpha$ -tokoferol üzerinde yoğunlaşmıştır.  $\alpha$ -tokoferol diyetle bulunan temel E vitamini faktörüdür.  $\alpha$ -tokoferol kanda  $\gamma$ -tokoferolden 4-10 kat fazladır.

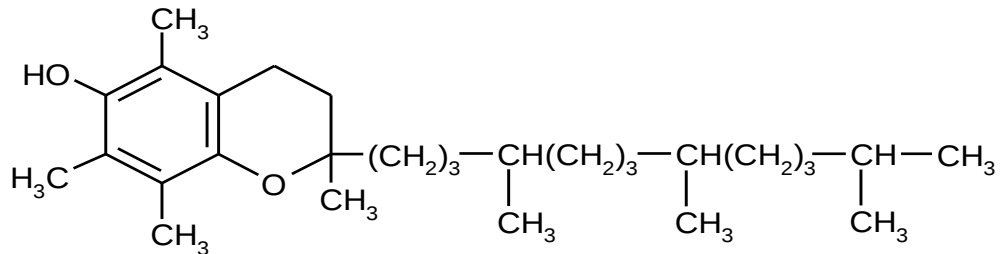
Tokoferoller lipitlerde ve organik çözücülerin çoğunda kolaylıkla çözünebilir, suda çözünmeyen, yapışkan kıvamlı ve açık sarı renkte görünüme sahiptir. E vitamini ısıya, alkalilere, asitlere ve görünür ışığa karşı dayanıklı olmasına rağmen ultraviyole ışıkta kolaylıkla bozulmaktadır (85). E vitamini aktivitesine sahip bileşiklerin 6-hidroksi kromanaromatik halkası içeren tokol veya tokotrienol nükleusları vardır. Tokol ve tokotrienolün birbirinden ayırımını sağlayan yapı 13 karbonlu yan zincirindeki çift bağların varlığıdır. Kroman halkasındaki metil gruplarının pozisyon ve sayısının farklı olması tokoferollerin birbirinden ayırımını sağlar (84-88).

#### **2.4.1. E Vitamininin Kimyasal Yapısı**

Ağız yoluyla alınan tokoferol gastrointestinal sistemden genelde iyi absorbe edilir. Yağda çözünen vitaminler grubunda yer alan E vitaminin absorpsiyonu safra tuzları ve lipitlerin varlığında kolaylaşır. Oral yoldan alınan tokoferoller, intestinal sistemde ince bağırsakta safra ile emülsifiye edildikten sonra reabsorbe edilir. Oral alımdan sonraki ilk birkaç saat absorpsiyon maksimum düzeydedir (88). Ortamda bozulmuş yağların bulunması durumunda E vitamini okside olur, mineral yağların bulunması durumunda ise E vitaminin absorpsiyonu inhibisyona uğrar (85).

Plazmada E vitamininin taşınması  $\beta$ -lipoproteinlere bağlanarak gerçekleşir. Tokoferolün safra ile atılım oranı çok düşük düzeydedir. Oral yoldan yüksek dozda tokoferol verildikten sonra insan idrarında; [(2-3-hidroksi-3-metil -5-karboksi pentil) - 3,5,6-trimetil hidrokinon ve tokoferolün gamma laktonu] tespit edilmiştir (89). E vitamini cinsiyet ve yaşa göre değişen oranlarda karaciğer ve yağ dokularında depo

edilmektedir (90). Dişı hayvanların dokularında tespit edilen E vitamini düzeyi erkek hayvanlara kıyasla daha yüksektir. E vitamini hipofiz bezi, adrenal bezlerde, uterusu ve plasentada da yüksek düzeyde depo edilmektedir (90). Tokoferol hücre içinde ise mitokondri, mikrozom ve lizozomlarda yoğun olarak bulunmaktadır (85).E vitamininin kimyasal yapısı Şekil 2.4.'te verilmiştir.



**Şekil 2.4.** E vitamininin kimyasal yapısı

#### 2.4.2. E Vitamininin Antioksidan Etki Mekanizması

Tokoferoller kolayca oksitlenebilmektedir ve oksitlenmeye en duyarlı olanı  $\alpha$ -tokoferoldur. E vitamininin antioksidan aktivitesi, yapısında yer alan  $\alpha$ -tokoferolden kaynaklanır.  $\alpha$ -tokoferol serbet radikaller ile reaksiyona girerek oksidasyona duyarlı moleküllerin oksidasyondan korunmasını ya da oksidasyonun azaltılmasını sağlayarak antioksidan aktivite gösterir (85). Hücresel hasarın oluşumunda önemli etkenlerin başında hücresel antioksidan düzeylerinin azalması sonucu oluşan oksidatif strestir (91).

Antioksidan maddeler genel olarak; oluşan serbest radikalleri süpürücü ve giderici etkileri ile bağlayarak veya kararlı hale getirerek (85), zincir kırıcı etki ile serbest radikal oluşumuna yol açan kimyasal reaksiyonları inhibe ederek (92), supresif etki ile reaksiyon hızını azaltarak (93), onarıcı etki ile lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşan hasarı rejenere ederek (94), hücresel kinaz kayıplarını önleyip oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak, organizmadaki SOD gibi enzimatik antioksidanların sentezini indükleyerek etkilerini gösterirler (95).

E vitamini serbest radikallerin bulunduğu biyolojik ortamlarda; serbest radikalleri süpürücü etkileri ve membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu erken dönemde baskılayarak oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Ayrıca E vitamininin lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırarak ve singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikallerini indirgeyerek antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (93). E vitamininin, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırarak antioksidan etki gösterdiği

bilinmektedir ancak son yapılan çalışmalar E vitamininin; radikal süpürme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı artırma mekanizmalarının hepsini kullanabilen son derece güçlü antioksidan olduğunu ortaya koymuştur (95).

#### **2.4.3. E Vitamininin Nöroprotektif Etkisi**

Özellikle beyin dokusunun antioksidan kapasitesinin düşük olması nedeni ile beyin dokusu oksidatif strese karşı oldukça hassastır ve E vitamini gibi güçlü antioksidanların koruyucu etkisine gereksinim duyar (96). Oldukça yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan E vitamini yağda çözünme özelliğinden dolayı kan–beyin bariyerini rahatlıkla geçerek santral sinir sisteminde güçlü nöroprotektif etki gösterir(97, 98). E vitamini plasentayı da rahatlıkla geçip fetal dokularda antioksidan etki göstermektedir. İntrauterin dönemde plasentayı kolaylıkla geçen E vitamininin çok büyük kısmı fetal beyin dokusu tarafından alınır (99).

Rota ve ark. E vitamininden yoksun diyetle beslenen ratların hipokampal nöronlarında gen transkripsiyonunun, nörotransmisyon, beta amiloid metabolizmasının, apoptosiz ve hormon metabolizmasının önemli ölçüde bozulduğunu rapor etmişlerdir. Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada, düşük E vitamini seviyelerinin; glial hücre fonksiyonlarını, nörogenezi, miyelinizasyonu ve sinaptogenezi bozduğu tespit edilmiştir (100).

Betti ve ark. Deneysel epilepsi modelinde ratlara E vitamininden zengin bir diyet uygulayarak yaptıkları çalışmada, ratların beyin dokusunda oksidatif stresin ve nöronal hücre hasarı ve kayıplarının oldukça azaldığını rapor etmişlerdir (101).

Galal ve ark. deltamethrin indüklü nörotoksisite oluşturulan ratlara E vitamini uygulanmasının, beyin dokusunun antioksidan kapasitesini artırdığını ve antiapoptotik etki meydana getirdiğini tespit etmişlerdir (102).

Kosta ve ark. fosfamidon indüklü nörotoksisite oluşturulan ratlara E vitamini verilmesinin, beyin dokusunda oksidatif stresi azalttığını, öğrenme ve hafıza üzerinde olumlu yönde etki gösterdiğini tespit etmişler ve E vitamininin önemli bir nöroprotektan olduğu yönünde görüş bildirmişlerdir (103).

#### **2.4.4. E Vitamini İçeren Gıdalar**

Başta tahıllar olmak üzere ıspanak, kabak, lahana, marul gibi yeşil sebzelerde, zeytinyağı, balık yağı, fındık, ceviz, ton balığı, sardalye, yumurta sarısı, domates ve

patateste bol miktarda E vitamini bulunur. Özellikle bir avuç fındık günlük E vitamini ihtiyacının büyük kısmını karşılayabilecek oranda E vitamini içermektedir. Günlük E vitamini ihtiyacı: bebeklerde 5–6 mg, 4–11 yaş arasındaki çocuklarda 7 mg ve 12 yaşından büyüklerde ise 8-10 mg kadardır (104).Çeşitli gıdaların E vitamini içeriği Tablo 2.3.'te verilmiştir.

**Tablo 2.3.** Çeşitli gıdaların E vitamini içeriği (105).

| <b>Gıdalar</b>     | <b><math>\alpha</math>-tokoferol miktarı<br/>(mg/ 100 gr gıda)</b> |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Sebzeler           | 90                                                                 |
| Sıvı yağlar        | 50                                                                 |
| Tahıllar           | 45                                                                 |
| Margarin           | 10.2                                                               |
| Fasulye            | 9                                                                  |
| Koyun ve sığır eti | 1.7                                                                |
| Tereyağı           | 1.6                                                                |
| Tavuk Eti          | 1.6                                                                |
| Yumurta            | 10.7                                                               |

### **3. MATERİYAL ve METOT**

#### **3.1. Araştırmada Kullanılan Materyaller**

##### **3.1.1. Kimyasal Malzemeler**

Araştırmamızın analiz aşamalarında Sigma, Merck, J.T. Baker, Akros firmalarından temin edilen analitik saflıktaki kimyasal malzemeler kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Cihazlar**

Araştırmamızın analiz aşamalarında tıp fakültesi biyokimya A.D. araştırma laboratuvarında bulunan homojenizatör, vorteks, manyetik karıştırıcı, santrifüjler, otomatik pipetler, hassas terazi, mikropipet yıkayıcı ve okuyucu, pH metre, su banyosu, -70 °C derin dondurucu, buz makinası, SDS-PAGE elektroforez ve western-blot sistemleri gibi cihazlar kullanılmıştır.

##### **3.1.3. Ratların Temini**

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 2019/A-33 nolu kararı ile onaylanan araştırmamız için gerekli olan 40 adet 200-250 gr ağırlığında 12 haftalık erişkin gebe Sprague Dawley dişi ratlar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden (İNÜTF-DEHÜM) temin edilmiştir.

#### **3.2. Metotlar**

##### **3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Ratların Bakımı**

Araştırmaya dahil edilen dişi ratlar, 2 dişiye bir erkek olacak şekilde akşam saat 17'de tekli kafeslere alındı. Ertesi gün sabah saat 08'e kadar aynı kafeste tutulan ratlardan bu sürenin bitiminde erkek olan ratlar kafeslerden uzaklaştırıldı. Erkek ratlarla aynı kafeste belli süre bırakılan dişi ratlardan vajinal smear alındı. Vajinal smear için puara sabitlenmiş pipete 0,5 mL serum fizyolojik çekilip rata karnı üstte başı aşağıda olacak şekilde pozisyonda vajinal yolla serum fizyolojik verilerek pipetin ucu vajinaya yerleştirilerek puar iki üç kez yavaşça sıkılarak vajinal sekresyon ve hücrelerin pipete alınması sağlandı. Pipetteki sıvıdan birkaç damla lam üzerine damlatılıp boyanmadan

ışık mikroskobunda incelendi. Vajinal Smearında sperm tespit edilen dişiler yarım günlük gebe olarak kabul edildi. Gebelikleri smear ile doğrulanmayan dişiler araştırmaya dahil edilmedi. Gebe ratlar, İNÜTF-DEHÜM’de, 20 gün (gebelik dönemi) süreyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamın sağlandığı ve aspiratörlerle sürekli havalandırılan  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ’lik odalarda tutuldular. Deney süresi boyunca ad libitum beslendiler. Her bir gruptaki gebe ratlar normal vajinal yolla fetuslarını doğurdu ve doğan bu yavrular 21. güne kadar beslenmeleri için annelerinin yanında bırakıldı. Postnatal laktasyon süresi bitiminde (3. haftanın sonu)erkek (E) / dişi (D) cinsiyet ayrımı yapılarak ayrı ayrı kafeslere alındı ve postanal 8. haftaya kadar adlibitum beslendiler.

Araştırmaya dahil edilen gebe ratlar ve erkek yavruları rastgele seçilerek aşağıdaki şekilde gruplara ayrıldılar.

Grup 1 (Kontrol grubu): Bu gruptaki 8 gebe rat gebelik ve laktasyon süresince normal yem ve su ile ad libitum olarak beslendi. Gebe ratların normal doğum sonrası yavruları laktasyon süresi bitiminde(postnatal 21. gün) erkek/dişi olmak üzere cinsiyet ayrımı yapılarak 8 adet erkek yavru rat, her birkafeste 4 adet rat olacak şekilde 2 ayrı kafese alındı ve araştırma süresince normal yem ve su ile ad libitum olarak beslenmeye devam edildi.

Grup 2 (İçme suyu ile AKR uygulanan grup): Bu gruptaki 12 adet gebe rata gebeliğin 0-20.günlerinde 100 ppm konsantrasyonda içme suyu ile AKR uygulandı. Gebe ratlara normal doğum sonrası laktasyon süresince içme suyunda 100 ppm konsantrasyonda AKR uygulanmaya devam edildi. Laktasyon süresi bitiminde (postnatal 21. gün) erkek/dişi olmak üzere cinsiyet ayrımı yapılarak 8 adet erkek yavru rat her bir kafeste 4 adet rat olacak şekilde 2 ayrı kafese alındı ve postnatal 8. haftaya kadar içme suyunda 100 ppm AKR verilmeye devam edildi.

Grup 3 (İçme suyu ile E vitamini uygulanan grup): Bu gruptaki 8 adet gebe ratın gebeliğin 0-20. günlerinde 500mg E vitamini/kg su içinde E vitamini alması sağlandı. Gebe ratlara normal doğum sonrası laktasyon süresince 500 mg E vitamini/kg su içinde E Vitamini uygulanmaya devam edildi. Yavrular laktasyon süresi bitiminde (postnatal 21. gün) erkek/dişi olmak üzere cinsiyet ayrımı yapılarak 8 adet yavru rat her bir kafeste 4 adet rat olacak şekilde 2 ayrı kafese alındı ve postnatal 8. haftaya kadar 500 mg /kg E vitamini içme suyu ile uygulanmaya devam edildi.

Grup 4 (İçme suyu ile AKR+ İçme suyu ile E vitamini uygulanan grup): Bu gruptaki 12 adet gebe rat, gebeliğin 0-20. günlerinde 100 ppm konsantrasyonda AKR ve 500 mg /kg E vitamini içme suyu ile uygulandı. Gebe ratlara normal doğum sonrası laktasyon süresince 100 ppm/kg konsantrasyonda AKR ve 500 mg /kg E vitamini içme suyu ile uygulanmaya devam edildi. Laktasyon süresi bitiminde (postnatal 21. gün) erkek/dişi olmak üzere cinsiyet ayrımı yapılarak 8 adet erkek yavru rat her bir kafeste 4 adet rat olacak şekilde 2 ayrı kafese alındı ve postnatal 8. haftaya kadar 100ppm/kg AKR ve 500 mg /kg E vitamini içme suyu ile verilmeye devam edildi.

### **3.2.2. Akrilamid ve E Vitamini Uygulama Yöntemi**

Gebelik ve laktasyon süresince annelere ve laktasyondan doğum sonrası 8. haftanın sonuna kadar yavrulara günde 100 ppm/ kg canlı ağırlık konsantrasyonda olacak şekilde AKR (Acrylamide; Sigma A8887) ve günde 500 mg/ kg canlı ağırlık konsantrasyonda olacak şekilde E vitamini ( $\alpha$ -Tocopherol Acetate; Sigma T3376) içmesuyu içerisinde çözülerek uygulandı (83, 106). Önce E vitamini daha sonrada AKR distile suda çözüldü ve AKR+E vitamini çözeltisi hazırlandı. Bu iki maddenin çözelti içinde birbiriyle etkileşime uğrayıp uğramadığı, çözeltide meydana gelebilecek bulanıklık, çökelti, renk değişimi gibi faktörler gözlemelenerek kontrol edilmiştir. 24 saat süreyle aralıklı olarak yapılan kontrollerde çözeltide herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir.

### **3.2.3. Numunelerin Alınması, Tartılması ve Analizlere Hazırlık İşlemleri**

Postnatal 8. haftanın bitiminde erkek yavru ratlara yüksek dozda ksilazin-ketamin (15 mg ksilazin - 120 mg ketamin) enjeksiyonu sonrası laparotomi yapıldı, kalp içinden kan numuneleri alındı ve serumları elde edildi. Daha sonra, tüm yavru ratlar dekapite edilerek üreme sistemi dokuları (testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat) ve karaciğer dokuları diseke edildi. Tüm gruplardaki ratlardan alınan üreme sistemi dokularının ağırlıkları tartıldı. Daha sonra testis ve karaciğerden örnekler alındı, fazlalık kanın uzaklaştırılması için serum fizyolojikle yıkandı ve kurulandı. RT-PCR analizleri için, aseptik şartlara dikkat ederek testis ve karaciğerden numuneler alındı ve RNA saklama çözeltisinde muhafaza edildi. Elde edilen serum, testis ve karaciğer doku örnekleri, analizleri daha sonra yapılmak üzere -70 °C’de saklandı.

Kontaminasyondan korunarak alınan testis dokusunun bir kısmı RNA denaturasyon çözeltisine konuldu ve PCR çalışması için saklandı.

### **3.2.4. Spermiyogram Analizi Yöntemi**

Epididimal sperm konsantrasyonu, Çiftci ve Ark. (107) tarafından tarif edilen modifiye bir yöntem kullanılarak hemasitometre ile tayin edildi. Sperm motilitesi (%) ise Çiftci ve ark. (108) tarafından açıklandığı gibi ısıtma tablalı bir ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi.

### **3.2.5. Testis ve Karaciğer Aromataz Geninin mRNA Düzeylerinin RT-PCR ile Analizi**

Testis ve karaciğer dokularından RNA saflaştırılması: Testis ve karaciğer numunelerinden total RNA saflaştırılması işlemi için. Doku numuneleri RNA saklama çözeltilisine alınarak muhafaza edildi. Dokulardan total RNA saflaştırılmasında QIAGEN firmasında temin edilen “RNeasy Mini Kit” (Lot no: 136261038 ve cat no: 74104) saflaştırma kiti kullanıldı. Total RNA saflaştırılmasının her aşaması, ilgili firmanın test protokülüne uyularak gerçekleştirildi. Testis ve karaciğer dokularından saflaştırılan total RNA’ların saflığı ve yıkımlanmanın olup olmadığı, RNA numunelerin inagarozelektroforezinde yürütülmesi ile kontrol edilmiştir.

Ayrıca testis ve karaciğer dokularından saflaştırılan total RNA’ların saflık ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak kontrol edildi. Spektrofotometrik analiz sonuçları ile, örneklerin saf RNA içerdiği ortaya konuldu. Örneklerin RNA miktarlarının tayini için, “Biotek” marka mikropley okuyucuda, “Gen5” programı kullanılarak örneklerin 260 ve 280 nm’de absorbanları ölçüldü ve absorbanların 260/280 oranları hesaplandı. RNA miktarları ng/μL olarak ifade edildi. Örneklerin 260/280 oranı yaklaşık 2 olanları cDNA sentezinde kullanıldı.

cDNA sentez protokolü: Ratların testis ve karaciğer doku numunelerinden saflaştırılan total RNA’lardan aromataz ve β-Aktin cDNA’larının sentezinde, Roche firmasından temin edilen “Transcriptor First strand cDNA Synthesis” analiz kiti (Ref No: 04 896 866 001)” kullanıldı. cDNA sentez ortamına ilave edilen RNA, deoksitritinükleotid, primerler, RNAaz inhibitörü, rivörs transkriptaz miktarlarının seçimi ve cDNA sentezinin her aşamasının şartları, ilgili firmanın direktiflerine uyularak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen aromataz ve β-Aktin cDNA’ları çoğaltılma işleminde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi.

cDNA’ların çoğaltılma protokolü: Aromataz ve β-Aktin cDNA’larının çoğaltılması işlemi, Roche Light Cycler 96 RT-PCR cihazında, Roche ve Tib Molbiol

firmalarından temin edilen “Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Ref No: 06 402 682 001)”, aromataze (Cyp19a1F TIB Reference No: 021112818, Product Description No: 2111358) ve  $\beta$ -Actin (Config No:100129896, AssayId: 500153, LOT:0000052091) genlerine spesifik hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. RT-PCR işleminin her aşaması ilgili firmaların direktiflerine uyularak gerçekleştirildi. Aromataz ve  $\beta$ -Aktin genlerine spesifik hidroliz problu primerlerinin dizilimleri Tablo 2.3’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Aromataz ve  $\beta$ -Aktin Primerlerinin Dizilimleri

| Gen            | Primer dizisi (Forward ve Reverse)                                     | Ref. Seq. Number |
|----------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|
| $\beta$ -Aktin | F: 5’ CTGGCTCCTAGCACCATGA 3’<br>R: 5’ TAGAGCCACCAATCCACACA 3’          | NM_031144        |
| Aromataz       | F: 5’ AACTACTACAATAAgATgTATggAgAgTTC3’<br>R: 5’ ATTCTCgTgCATgCCAATg 3’ | NM_017085        |

Gruplardan elde edilen testis ve karaciğer doku örneklerinden saflaştırılan RNA’lardan sentezlenen cDNA’lar,  $\beta$ -Aktin ve Aromataz genlerine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltıldı. Aromataz genin ifade edilme düzeyleri  $\beta$ -aktin genine oranlanarak hesaplandı.

### 3.2.6. Testis ve Karaciğer Aromataz Proteini Düzeylerinin Western-Blot Yöntemi ile Analizi

Deney gruplarına ait testis dokuları 1 mM PMSF ve proteaz inhibitör kokteili içeren RIPA tamponda lize edildi. Western-blot ile analiz edilecek olan her gruptan örnekler eşit miktarda (~30  $\mu$ g) protein, SDS-PAGE jelinde kuyucuklara yüklendi ve elektriksel güç uygulanarak molekül ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı. Daha sonra jeldeki proteinler PVDF membrana transfer edildi ve aromataz proteini western-blot yöntemi ile görünür hale getirildi.

Proteinlerin SDS-PAGE elektroforezinde yürütülmesi: Testis ve karaciğer numunelerinin ekstraksiyonu ile elde edilen protein örnekleri poliakrilamid jele yüklendi. Protein yüklenmesinden hemen sonra sisteme DC elektrik verildi. Protein bandlarının jelin stoklama kısmının sonuna kadar yürütülmesi için 100 Volt gerilim uygulandı. Protein bandlarının jelin stoklama kısmından ayırma kısmına geçişi sonrası,

gerilim 150-200 Volt'a çıkartıldı. Brom fenol mavisi ayırma jelinin alt ucuna ulaşınca gerilim kesilip jel tanktan çıkartıldı.

Proteinlerin jelden PVDF membrana semi-dry transferi: Transfer için önce jel tanktan çıkartıldı ve tarak kısımları kesilip atıldı. Daha sonra jel hazır olarak aldığımız membranın üzerine konulup üzeri kapatıldı. Ufak rulo ile hava kabarcığı kalmaması için üzerinden tek yöne doğru geçirildi. Daha sonra transfer cihazının kasetine membran altta kalacak şekilde yerleştirildi. Trans-Blot turbo cihazı hazır jel kullanımı için uygun programda çalıştırıldı ve 7-10 dk içerisinde jelden proteinlerin membrana aktarılması gerçekleştirildi.

PVDF membranın Bloklanması: Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi sonrası membran 1.5 saat süreyle %5'lik süt tozu ve %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisinde (bloklama çözeltisi) çalkalanarak inkübe edildi. Bloklama işleminin sonunda membran, %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile 3 defa yıkandı.

PVDF membranın birincil antikor ile inkübasyonu: Membran, anti-rat aromataz birincil antikorlu içeren bloklama çözeltisine alındı, +4 °C'de bir gece düşük çalkalama ile inkübe edildi. Inkübasyonun sonunda membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı. Yıkama sonunda, membrana bağlanmamış olan anti-rat aromataz antikorları uzaklaştırılmış oldu.

PVDF membranın ikincil antikor ile inkübasyonu: Membranın yıkanarak bağlanmayan birincil antikorun uzaklaştırılması sonrası, bloklama çözeltisine ilave edilen HRP bağlı ikincil antikor ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı ve bağlanmamış olan ikincil antikorlar PVDF membrandan uzaklaştırıldı.

PVDF membranın ECL ile inkübasyonu ve aromataz bandlarının görüntülenmesi: İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, elektrokemilüminisans (ECL) çözeltisi içinde bulunan substratı katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan lüminol ışımaya yol açar. Bu ışımaya, görüntüleme cihazı ile protein bandları şeklinde görüntülenir.

### **3.2.7. Serum Testosteron, Östradiol, LH, FSH Düzeylerinin Analizi**

Serum testosteron, östradiol, LH, FSH düzeyleri, ticari ELISA kitleri (BT lab, Andygene) kullanılarak mikropleyt okuyucu ile (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, USA) analiz edildi.

### **3.2.8. Histopatolojik İnceleme Yöntemi**

Araştırmanın tamamlanmasını müteakiben, erkek yavru ratların tek taraflı testis dokuları, tespit amacı ile %10'luk formaldehit çözeltisine alındı ve 3 gün süreyle bu çözeltide bekletildi. 3. günün sonunda dokular çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra rutin histolojik doku takibi prosedürleri uygulanarak dokuların dehidrasyon ve parlatma işlemleri gerçekleştirildi. Parlatma işlemi tamamlanan dokular parafinle kaplanarak bloklar haline getirildi. Parafine edilen dokuların histopatolojik incelemeleri için bu bloklardan 8 µm kalınlıkta kesitler alındı.

Tüm grupların parafinize edilmiş testis numunelerinden elde edilen kesitler deparafinize edildi ve hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı. Boyanan kesitler Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, Nikon DS Fi2 kamera ve Nikon Nis-Elements görüntüleme sisteminde (Nikon Corporation, Tokyo Japan) analiz edildi. Testis dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler incelenerek fotoğrafları alındı (109).

### **3.2.9. Verilerin İstatistiksel Analizi**

Verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 21.0 programı kullanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testiyle kontrol edilmiştir. Verilerin normal dağılım göstermemesi nedeni ile verilerin değerlendirilmesinde nonparametrik istatistiki test kullanıldı ve sonuçlar ortanca (min-maks) olarak verildi. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar Conover testiyle yapıldı. Tüm testler için  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1.Gruplarının Testis, Epididimis, Seminal Vezikül ve Prostat Ağırlıkları

Gruplarının testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat ağırlıklarının istatistiki sonuçları incelendiğinde, AKR uygulaması testis ve epididimis ağırlıklarını önemli oranda azaltırken, seminal vezikül ağırlığındaki azalma istatistiki olarak anlamlı değildi. AKR uygulaması prostat doku ağırlığını anlamlı derecede artırdı. AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat ağırlıklarında kısmi bir iyileşme sağladı. Grupların üreme sistemi dokularının ağırlıkları Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Gruplarının testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat ağırlıkları

| Gruplar    | Testis ağırlığı(g)      |                         | Epididimis ağırlığı(g)  |                         | Seminal vezikül ağırlığı(g) | Prostat ağırlığı (g)    |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
|            | Sağ                     | Sol                     | Sağ                     | Sol                     |                             |                         |
| Kontrol    | 1.384±0.02 <sup>a</sup> | 1.340±0.02 <sup>a</sup> | 0.642±0.01 <sup>a</sup> | 0.634±0.04 <sup>a</sup> | 1.162±0.11 <sup>a</sup>     | 0.240±0.04 <sup>a</sup> |
| E Vitamini | 1.624±0.05 <sup>b</sup> | 1.597±0.04 <sup>b</sup> | 0.601±0.03 <sup>a</sup> | 0.612±0.01 <sup>a</sup> | 1.331±0.10 <sup>a</sup>     | 0.337±0.04 <sup>b</sup> |
| AKR        | 1.088±0.04 <sup>c</sup> | 1.028±0.04 <sup>c</sup> | 0.488±0.02 <sup>b</sup> | 0.467±0.01 <sup>b</sup> | 1.067±0.05 <sup>a</sup>     | 0.327±0.03 <sup>b</sup> |
| AKR+E vit. | 1.150±0.01 <sup>c</sup> | 1.101±0.01 <sup>c</sup> | 0.494±0.03 <sup>b</sup> | 0.495±0.02 <sup>b</sup> | 1.127±0.08 <sup>a</sup>     | 0.332±0.04 <sup>b</sup> |

Aynı sütunda farklı üst simge harfleri taşıyan gruplar arasındaki ortalama fark istatistiksel olarak anlamlıdır (a,b and c; p<0,05).

### 4.2.Gruplarının Spermiyogram Sonuçları

Gruplarının spermiyogram sonuçları incelendiğinde, AKR uygulaması epididimal sperm konsantrasyonunu anlamlı oranda düşürürken, spermelerde kuyruk ve baş anomali oranını ve toplam anormal sperm oranını önemli derecede artırmış, sperm hareketliliği üzerindeki azaltıcı etkisi sınırlı kalmıştır. AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması sperm konsantrasyonundaki düşüş üzerindeki etkisi sınırlı olmakla beraber, anormal sperm oranını kontrol grubu değerlerine düşürmüştür. Grupların spermiyogram sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir

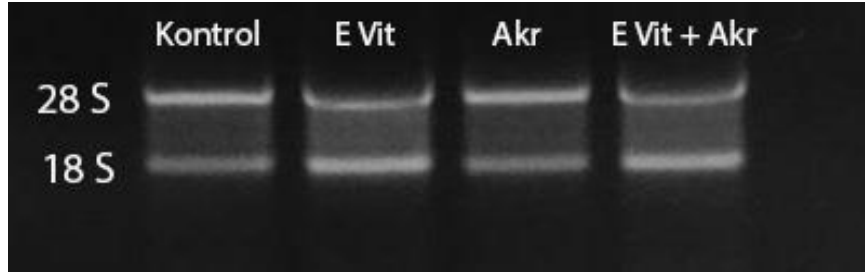
**Tablo 4.2.** Gruplarının spermiyogram sonuçları

| Gruplar     | Sperm hareketliliği (%) | Epididimal sperm konsantrasyonu (milyon/g doku) | Anormal sperm oranı (%) |                        |                        |
|-------------|-------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
|             |                         |                                                 | Baş                     | Kuyruk                 | Toplam                 |
| Kontrol     | 80.47±1.88 <sup>a</sup> | 327.85±2.59 <sup>a</sup>                        | 4.00±0.30 <sup>a</sup>  | 4.00±0.21 <sup>a</sup> | 8.00±0.43 <sup>a</sup> |
| E Vitamini  | 83.56±2.03 <sup>a</sup> | 348.00±2.32 <sup>a</sup>                        | 3.00±0.37 <sup>b</sup>  | 3.28±0.20 <sup>b</sup> | 6.28±0.64 <sup>b</sup> |
| AKR         | 77.61±1.19 <sup>a</sup> | 242.28±5.44 <sup>b</sup>                        | 4.57±0.36 <sup>c</sup>  | 5.28±0.35 <sup>c</sup> | 9.85±0.63 <sup>c</sup> |
| AKR+E vit.i | 80.71±0.80 <sup>a</sup> | 263.28±4.56 <sup>b</sup>                        | 3.85±0.26 <sup>a</sup>  | 4.28±0.28 <sup>a</sup> | 8.14±0.34 <sup>a</sup> |

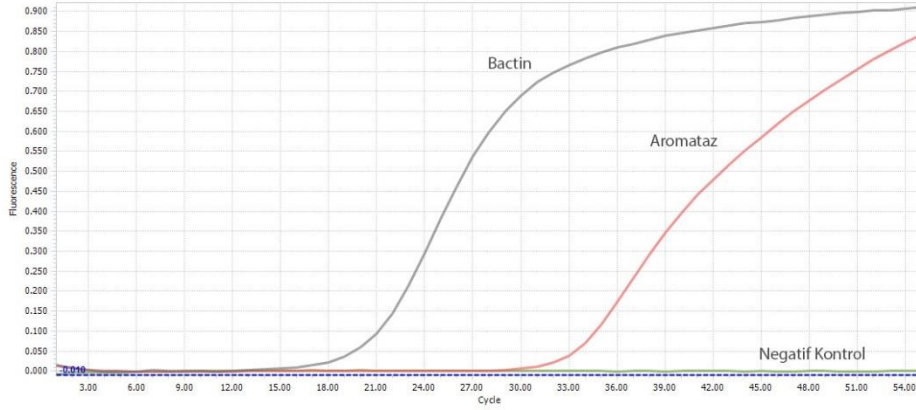
Aynı sütunda farklı üst simge harfleri istatistiksel olarak anlamlıdır (a, b ve c; p<0.05).

#### 4.3. Grupların Aromataz Geni mRNA'sının RT-PCR Sonuçları

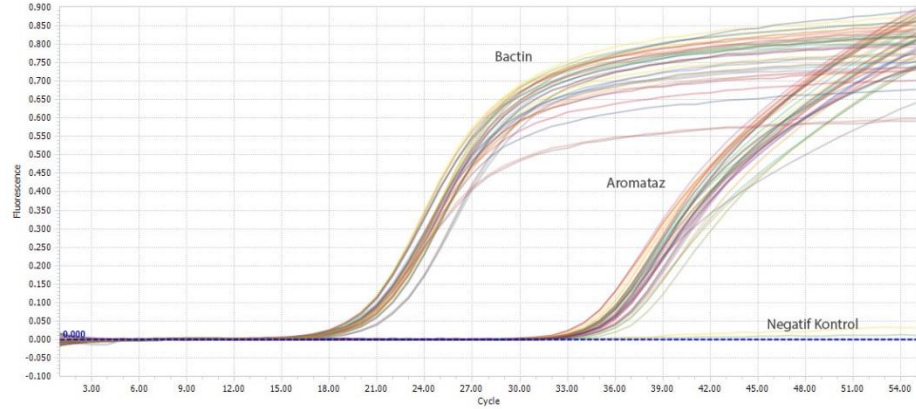
Her bir grubun testis dokularından 28S ve 18S ribozomal RNA'lar saflaştırılmış, bantlarının mevcudiyeti ve bandlarda herhangi bir yıkılımın olup olmadığı agaroz elektroforezi ile kontrol edildi. Şekil 4.1'de verilen elektroforegram, 28S ve 18S ribozomal RNA bantlarının mevcut olduğu ve bandlarda herhangi bir yıkılım meydana gelmediğini göstermektedir.

**Şekil 4.1.** Her bir gruba ait testis dokularından saflaştırılan RNA'ların elektroforegramı

Gen analizleri "Hydrolysis Probe" kullanılarak yapılmıştır.  $\beta$ -aktin ve aromataz mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR ile çoğaltımı gerçekleştirilmiştir.  $\beta$ -aktin ve Aromataz mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR ile çoğaltım eğrisi ve total çoğaltım eğrisi Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'de verilmiştir.

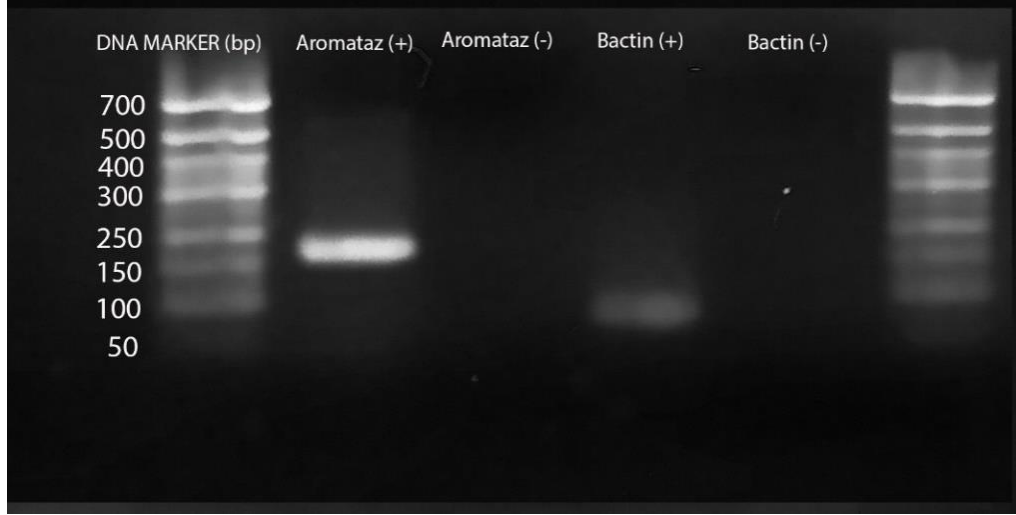


**Şekil 4.2.**  $\beta$ -aktin ve Aromataz mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR ile çoğaltım eğrisi.



**Şekil 4.3.**  $\beta$ -aktin ve Aromataz mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR ile total çoğaltım eğrisi.

RT-PCR ile  $\beta$ -aktin ve Aromataz cDNA'larının sentezi sonrası, primer bağlanmasının özgülüğü kontrol etmek için agaroz jelinde örnekler yürütülmüştür. Elektroforezde  $\beta$ -aktin ve Aromataz genleri için tek ve istenilen boyda DNA bandlarının olduğu görüldü. Agaroz jelde elde edilen elektroforegram Şekil 4.4.'de verilmiştir.



**Şekil 4.4.**  $\beta$ -aktin ve Aromataz cDNA'larının RT-PCR'daki çoğalımının elektroforegram görüntüsü. Elektroforezde 50 bp'lik DNA markırı kullanılmıştır (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).

Grupların testis dokusunda RT-PCR ile yapılan aromataz ve beta aktin mRNA analizleri, AKR uygulamasının testis aromataz/beta aktin mRNA oranlarını ciddi derecede artırdığını göstermektedir. Bu sonuçlar, AKR uygulamasının testis aromataz geninin transkripsiyonunu artırdığını ortaya koymaktadır. AKR+E vitamini grubunda ise E vitamini uygulaması aromataz/beta aktin oranını kontrol grubu değerlerine düşürmüştür. Gruplarda hesaplanan testis Aromataz/ $\beta$ -aktin mRNA oranları Tablo 4.3.'de verilmiştir.

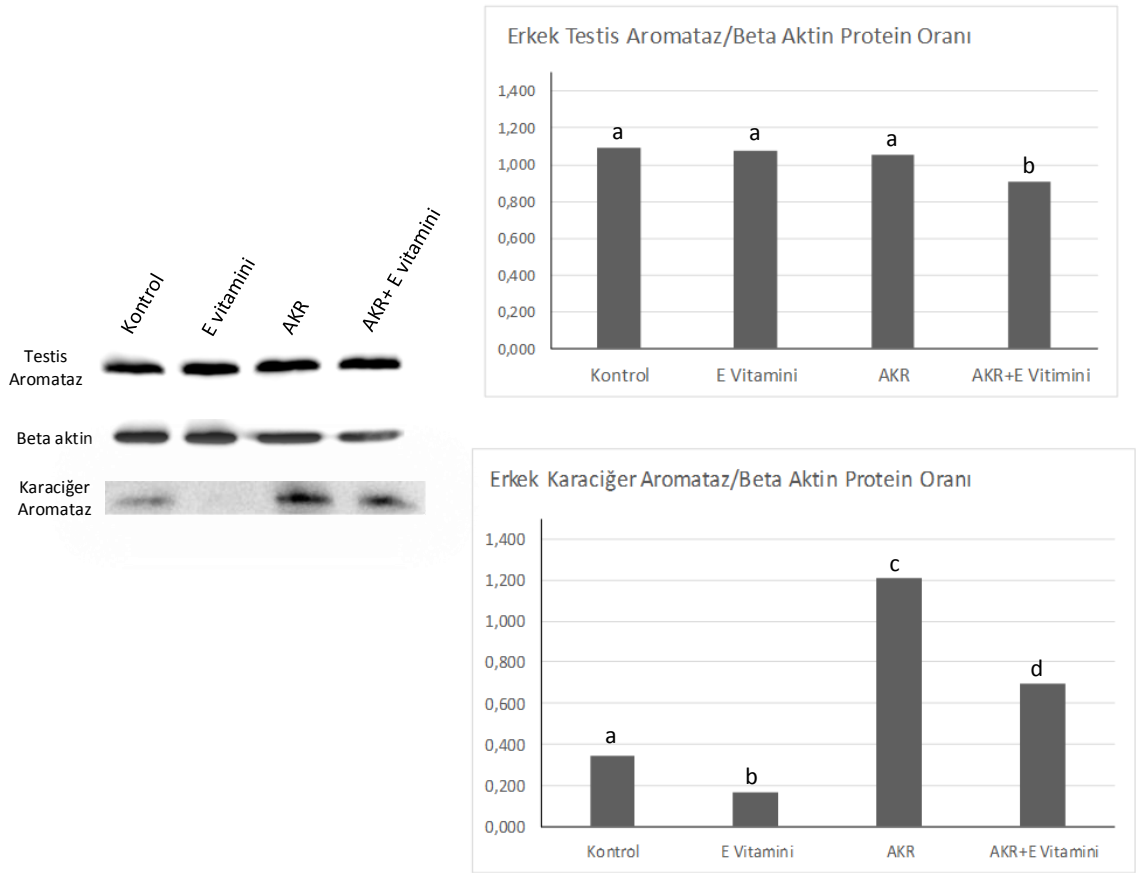
**Tablo 4.3.** Gruplarda hesaplanantestis aromataz/ $\beta$ -aktin mRNA oranı

| Gruplar        | Aromataz/ $\beta$ -aktinmRNA oranı<br>Medyan (min-maks) |
|----------------|---------------------------------------------------------|
| Kontrol        | 0.026 <sup>a</sup> (0.022-0.028)                        |
| E vitamini     | 0.029 <sup>a</sup> (0.015-0.032)                        |
| AKR            | 0.039 <sup>b</sup> (0.031-0.049)                        |
| AKR+E vitamini | 0.028 <sup>a</sup> (0.020-0.040)                        |
| p              | 0.026                                                   |

\*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı.

#### 4.4. Grupların Testis ve Karaciğer Aromataz Proteininin Western-Blot Sonuçları

Grupların testis ve karaciğer dokularından ekstrake edilen aromataz ve beta aktin proteinleri western-blot ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları, AKR uygulamasının testis aromataz düzeyini etkilemediğini, karaciğer aromataz düzeyini ise anlamlı derecede artırdığını göstermektedir. AKR+E vitamini grubunda ise karaciğer aromataz düzeyi önemli oranda azalmıştır. Grupların testis ve karaciğer aromatazına ait protein bandları ve aromataz/beta aktin oranları Şekil 4.5'te verilmiştir.



**Şekil 4.5.** Grupların testis ve karaciğer aromatazına ait protein bandları ve aromataz/beta aktin oranları. \*Farklı harflere sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı.

#### 4.5. Grupların Serum Testosteron, Östradiol, FSH ve LH Sonuçları

Gruplarda ölçülen serum Testosteron, Östradiol, FSH ve LH sonuçları, AKR uygulamasının serum testosteron düzeylerini anlamlı derecede düşürdüğünü, serum östradiol düzeyini ise önemli oranda artırdığını göstermektedir. AKR+ E vitamini

grubunda E vitamini uygulaması ise serum hormon düzeylerini kontrol grubu değerlerine getirmiştir. Gruplarda ölçülen serum testosteron, östradiol, FSH ve LH sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir

**Tablo 4.4.** Grupların Testosteron, Östradiol, FSH ve LH sonuçları

| Grup       | FSH (U/L)                      | LH (U/L)                      | Testosteron (ng/mL)              | Östradiol (ng/L)                    |
|------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Kontrol    | 7.76 <sup>a</sup> (7.18-8.27)  | 5.92 <sup>a</sup> (5.44-6.66) | 19.46 <sup>a</sup> (18.19-22.03) | 607.24 <sup>a</sup> (588.99-617.51) |
| E Vitamini | 8.184 <sup>a</sup> (7.44-8.86) | 6.25 <sup>a</sup> (5.60-6.60) | 20.94 <sup>a</sup> (19.78-22.38) | 603.25 <sup>a</sup> (588.76-612.70) |
| AKR        | 6.99 <sup>a</sup> (6.28-7.90)  | 5.47 <sup>a</sup> (5.12-6.10) | 14.03 <sup>b</sup> (12.48-16.14) | 707.85 <sup>b</sup> (697.04-720.92) |
| AKR+E Vit. | 7.436 <sup>a</sup> (6.68-8.33) | 5.83 <sup>a</sup> (5.22-6.29) | 18.53 <sup>a</sup> (17.75-19.66) | 627.33 <sup>a</sup> (599.41-638.30) |
| p          | >0.05                          | >0.05                         | <0.05                            | <0.05                               |

\*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

#### 4.6. Grupların Testis Histopatolojisi Sonuçları

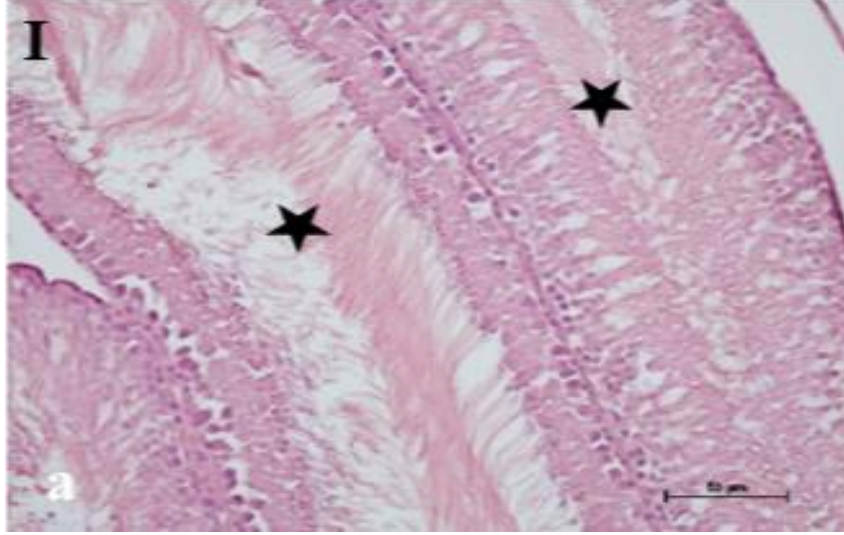
Kontrol ve vitamin E gruplarında, seminifer tübül ve interstisyel doku alanları normal histolojik yapıda görüldü. Seminifer tübüllerin germinatif epitelileri spermatogenik seri hücrelerini içerecek şekilde çok tabakalı olarak izlendi. Bazı seminifer tübüllerin lümenlerinde spermatozoonlar izlendi (Şekil 4.2- I, II).

AKR grubunda seminifer tübüllerde farklı derecelerde hasar izlendi. Bazı seminifer tübüllerde total germinatif epitel hasarı, germinatif epitelde dökülme ve seminifer tübül atrofiksi dikkati çekti. Seminifer tübüllerde hasar, spermatogonyum kaybı seviyesinde izlendiği gibi, daha hafif olacak şekilde spermatid ve spermatozoon hasarı seviyesinde de izleniyordu. İnterstisyel alanlarda Leydig hücrelerinde farklı derecelerde vakuolizasyon ve yer yer dejenerasyon tespit edildi. (Şekil 4.2.- III).

AKR+ E vitamini grubunda bazı seminifer tübüllerde germinatif epitelde dökülme, hücreler arası alanlarda genişleme saptandı. İnterstisyel alanlarda Leydig hücreleri normal histomorfolojiye sahipti. Bu grubun histolojik hasar düzeyi kontrol ve vitamin E grubundan daha yüksek, AKR grubundakinden ise daha düşük olarak değerlendirildi (Şekil 4- IV).

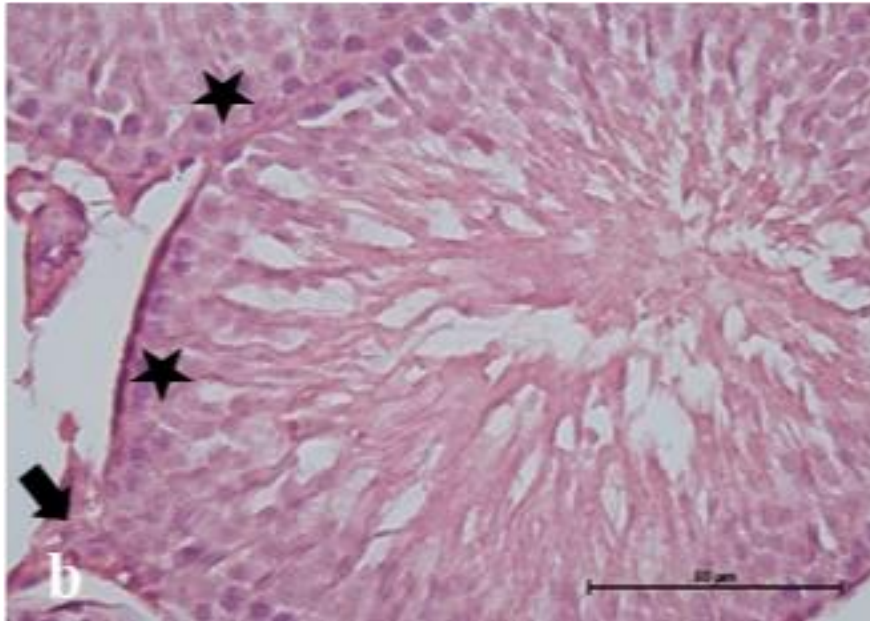
#### 4.6.1. Kontrol Grubu Testis Dokusunun Histopatolojik Bulguları

Kontrol grubu testis dokusuna ait histopatolojik bulgular Şekil 4.6-4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.

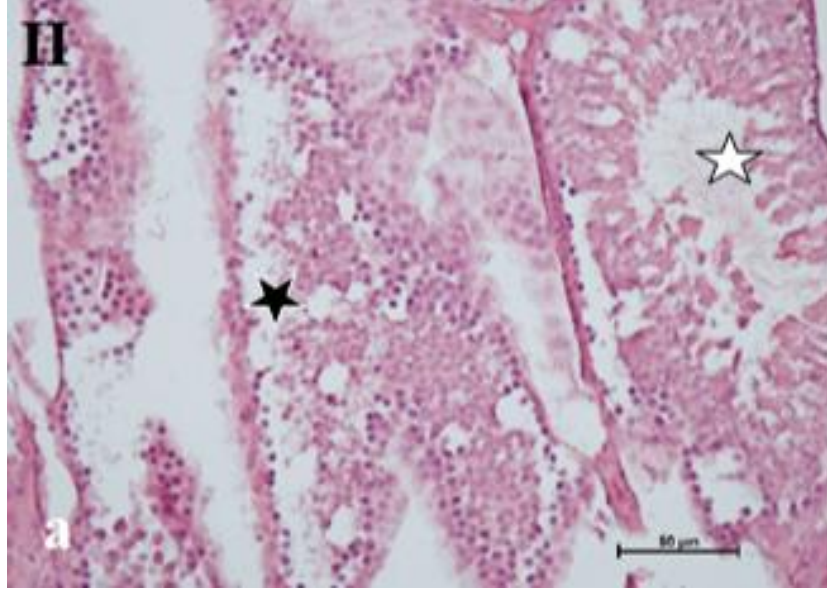
Normal histolojik görünüm (yıldız).H-E, x20.



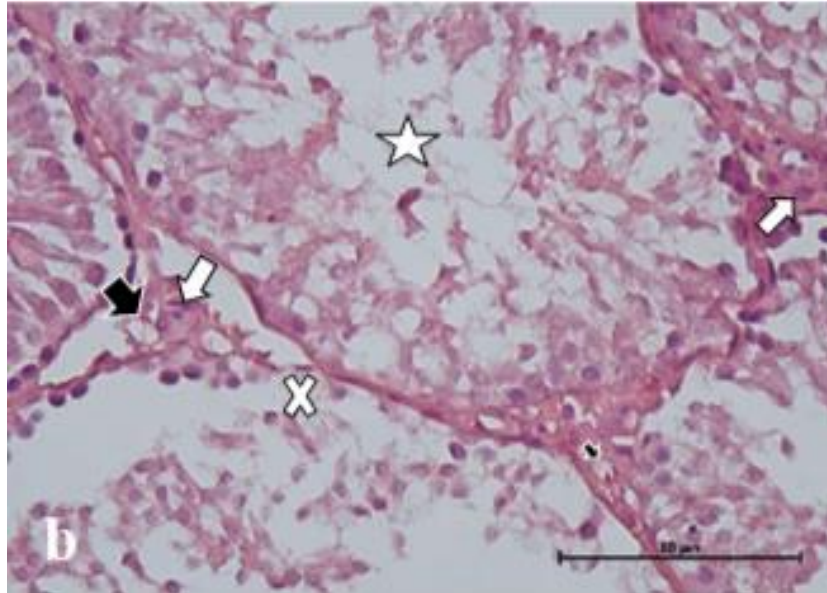
Şekil4.7. Kontrol grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. Seminifer tübüllerde normal seminifer epitel (yıldız) ve interstisyel doku (ok). H-E, x40.

#### 4.6.2. AKR Grubu Testis Dokusunun Histopatolojik Bulguları

AKR grubunun testis dokusuna ait histopatolojik bulguları Şekil 4.8-4.9'de verilmiştir.



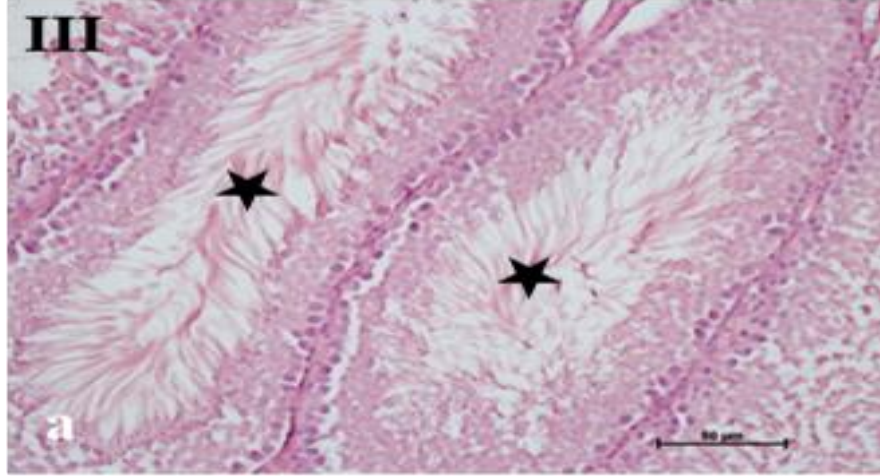
**Şekil 4.8.** AKR grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. Seminifer tübüllerde, seminefer epitelinde dejenerasyon (siyah yıldız) ve kısmi hasar (beyaz yıldız).H-E, x20.



**Şekil 4.9.** AKR grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. Seminifer tübüllerde hasar, spermatid kaybı (beyaz yıldız),seminifer tübül epitelinde spermatogonyum kaybı (X),interstisyel alanlarda ve Leydig hücrelerinde farklı derecelerde hasar (beyaz ok), damar hasarı (siyah ok).H-E, x40.

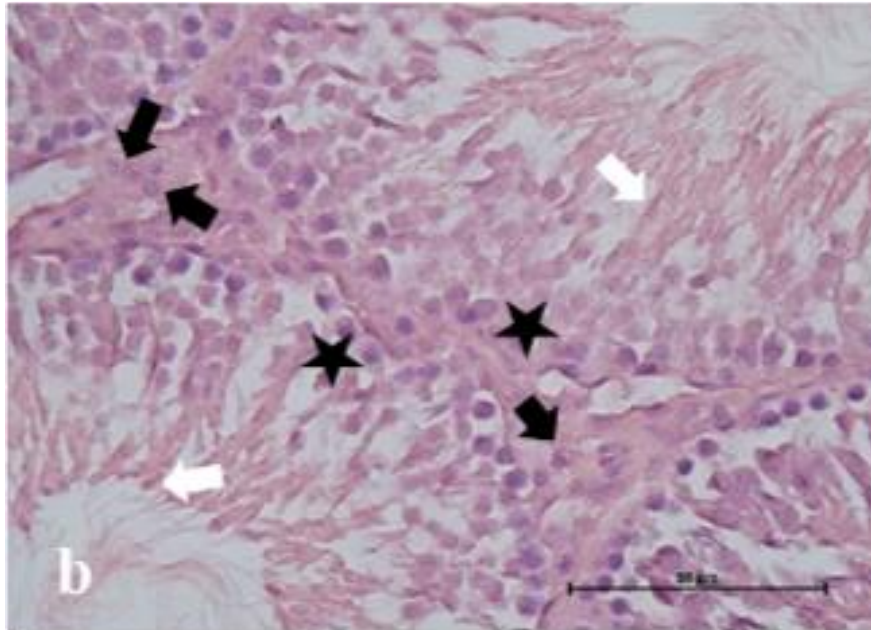
#### 4.6.3. E Vitamini Grubu Testis Dokusunun Histopatolojik Bulguları

E vitamini grubu testis dokusunun histopatolojik bulguları Şekil 4.10-4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.10. E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.

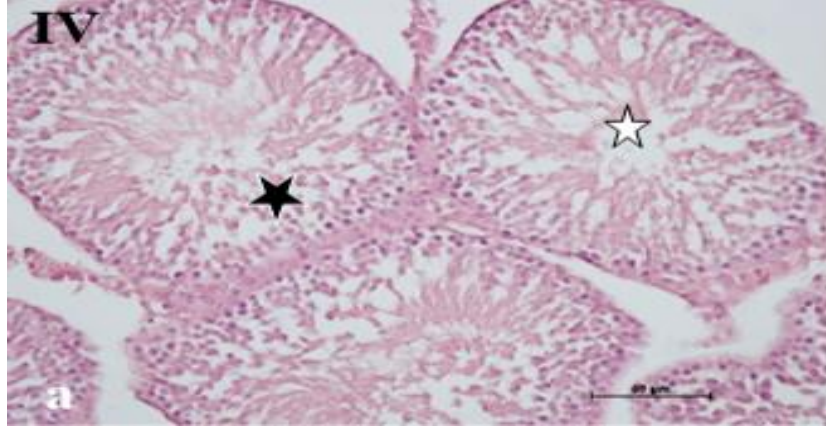
Normal histolojik görünüm (yıldız).H-E, x20.



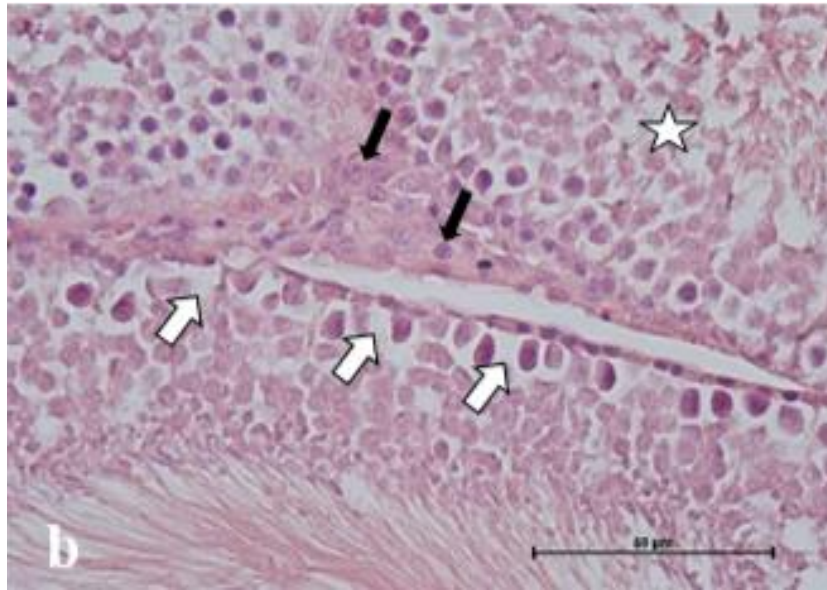
Şekil 4.11. E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. Normal görünümde interstisyel doku ve Leydig hücreleri (siyah ok), Seminifer tübüllerde normal seminifer epitel (yıldız), spermatid ve spermatozoonlar (beyaz ok).H-E, x40.

#### 4.6.4. AKR+E Vitamini Grubu Testis Dokusunun Histopatolojik Bulguları

AKR+E vitamini grubu testis dokusunun histopatolojik bulguları Şekil 4.12-4.13'de verilmiştir.



**Şekil 4.12.** AKR + E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. Normal histolojik görünüme (beyaz yıldız) ve seminifer tübül epiteline (siyah ok) sahip seminifer tübüller. H-E, x20.



**Şekil 4.13.** AKR + E Vitamini grubu testis dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü. Normal seminifer epitel (beyaz yıldız) ve bazı seminifer tübüllerde germinatif epitelde dökülme, hücreler arası alanlarda genişleme (beyaz ok), normal histolojik görünümde interstisyel alanlar ve Leydig hücreleri. H-E, x40.

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde erkeklerde kısırılık oranları önemli oranda artış göstermiştir. DSÖ, geçen yüz yıla göre erkeklerde sperm sayısının çok ciddi derecede azaldığını, geçen yüz yılda sperm sayısı mililitrede 100-120 milyon iken günümüzde bu rakamın 15-20 milyona kadar düştüğünü ve daha dikkat çekici olması açısından, son 30 yılda erkeklerde sperm sayısında ortalama %40 oranında azalmanın meydana geldiğini açıklamıştır. Her ne kadar kısırılığın tek sebebinin sperm sayısının düşmesi olmasa da, sperm sayısındaki bu dramatik düşüş erkeklerde kısırılığın artışı tetiklemiş olabilir. Erkeklerde meydana gelen kısırılığın yaklaşık %80'nin sebebi bilinmemektedir. Bu durum kısırılığın sebebine yönelik etkili tedavi protokollerinin geliştirilmesini de engellemekte ve çocuk sahibi olamayan çiftlerin tüp bebek tedavisine yönelmelerine neden olmaktadır. Konunun uzmanları erkeklerde kısırılığın artışında su ve çevre kirliliği; gıda, su ve hava ile aldığımız toksik maddelerin ve ağır metallerin önemli etkilerinin olduğunu vurgulamışlardır.

AKR doğal olarak bulunan bir kimyasal değildir ve besinlerin doğal yapısında bulunmaz. Ancak yapılan araştırmalar AKR'nin, karbonhidrat ve proteinden zengin gıdaların 120 °C'den yüksek sıcaklıklarda hazırlanması neticesinde ortaya çıktığını ve bu gıdalarla beslenen insanlarda AKR'nin ciddi sağlık problemlerine yol açma potansiyeline sahip toksik bir kimyasal olduğunu ortaya koymuştur (110). Asparajın gıdalara renk, lezzet ve aroma kazandıran bir amino asittir. Gıdaların 120 °C'den yüksek sıcaklıklarda hazırlanması aşamasında asparajın amino asidi indirgen şekerlerle reaksiyona girer. Zincirleme reaksiyonlar sırasında (Maillard reaksiyonu) asparajın ve indirgen şekerlerin etkileşimi ile AKR oluşur. Çok farklı içerikteki gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi sırasında da Maillard reaksiyonu ile bol miktarda AKR oluşmaktadır. Bu mekanizma, gıda kaynaklı AKR'nin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Gıdaların çiğ veya haşlanarak tüketilmesinde, AKR oluşumu bakımından bir riskin bulunmadığı rapor edilmiştir (111).

AKR'nin insanlar ve hayvanlarda neden olduğu toksikasyonları araştırmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, AKR toksikasyonları ile ilgili önemli risk değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu risk değerlendirmelerinde, AKR'nin özellikle nörotoksik, karsinojenik ve üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri irdelenmiştir. 1990 – 2002 yılları arasında AKR'nin toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmaların verilerinin

incelenerek risk değerlendirmelerinin yapıldığı bir retrospektifderleme makalede (112), AKR'nin deney hayvanları ve insanlar için karsinojenik olduğu rapor edilmiştir. Bu durum çok sayıda ülkenin resmi sağlık ve gıda otoritelerince değrulanmıştır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (USA-EPA), insanların maruz kaldığı günlük AKR miktarı ile kansere yakalanma riski hakkında yaptığı değerlemede, hayat boyu 1  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{g}^{-1}$  dozda AKR'ye maruz kalan insanlarda kansere yakalanma ihtimalinin %0.45, 0.02  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{g}^{-1}$  dozda AKR'ye maruz kalanlarda ise bu ihtimalin %0.01 olabileceğini açıklamıştır. WHO ise, hayat boyu günlük 0.14  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{g}^{-1}$  AKR alan insanlarda kansere yakalanma olasılığının %0.01 olabileceği bildirmiştir (113). Tüm bu veriler, AKR'nin insanlar için nörotoksik ve karsinojenik olduğu konusunda uluslararası otoritelerin fikir birliği içinde olduğunu göstermektedir. Ancak AKR'nin insanlar içintam olarak karsinojenik olduğunu söylememize imkan sağlayacak sayıda araştırma ve veri bulunmamaktadır. Bu durum, AKR'nin insanlarda karsinojenik olduğuna dair kesin ve güvenilir bir değerlendirme yapılmasını engellemektedir (114). Ancak, amerikadaki bazı tüketici dernekleri, AKR içeren gıdaların üzerine “kanserojen etkili AKR maddesi içerir” ifadesinin yazılmasının kanuni bir zorunluluk haline getirilmesini talep etmektedirler.

AKR konusundaki farkındalığın ülkemizdeki durumuna bakıldığında, gerek resmi ve gereksede sivil kamuoyunda henüz her hangi bir risk değerlendirilmesinin ya da açıklamanın yapılmadığını görüyoruz. Gıda kaynaklı AKR konusunda TÜBİTAK'ın desteklediği bir araştırma yapılmış ve sonuçları yayımlanmıştır. Ancak devletin herhangi bir kurumunca AKR konusunda bir risk değerlendirme raporu yayımlanmamıştır.

Ağız yoluyla alınan AKR bağırsaklardan emilir ve kana geçer. AKR kandan öncelikle karaciğer ve diğer dokulara alınır ve metabolize edilir. AKR'nin yarılanma süresi kısadır ve diğer dokulara hızlı bir şekilde alınarak kandan temizlenmektedir. AKR, yüksek dercede hidroflik özellikte bir kimyasaldır. Ancak, deney hayvanlarında yapılan araştırmalar, AKR'nin plasentayı geçebildiğini, fetüs dokularına ulaştığını ve toksik etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur (115). Deney hayvanlarında fetal hayatta AKR'nin meydana getirdiği gelişim bozukluklarını araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Deneysel araştırmaların sonuçları, AKR'nin insan fetuslarında meydana getirebileceği muhtemel gelişim bozuklukları ve hasarları incelemek üzere insan çalışmalarının yapılmasına temel teşkil etmiştir.

El-Sayyad ve ark. farelere gebeliğin 6-21. günleri arasındaki canlı ağırlığa 25 mikro g/gündoza AKR uygulayarak, diğer bir gruba ise yaklaşık %33 kızarmış patates cipsi (KPC) içeren yemle besleyerek yaptığı araştırmada, AKR ve KPC uygulamasının annelerin karaciğer, böbrek, kalp ve kemik dokularında benzer histopatolojik bozuklara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer histopatolojik hasarlar AKR ve KPC uygulanmış grupların yavrularında da gözlemlenmiştir. AKR ve KPC uygulaması gebe farelerde düşük oranını artırmış, doğan yavru sayısını, yavru canlı ağırlığını ve büyüklüğünü anlamlı derecede azaltırken, doğan yavrularda gelişme geriliği meydana getirmiştir. Araştırmacılar bu sonuçları, uzun süre KPC tüketiminin insanlarda ciddi sağlık problemlerine yol açabileceği şeklinde yorumlamışlardır (82).

Allam ve ark. AKR'nin fetüs ve laktasyon sonuna kadar ki yavru gelişimi üzerindeki etkilerini incelemek üzere, gebeliğin 7. günü ile postnatal 28. güne kadar gebe ratlara ve doğan yavrularına 10 mg/kg/gün oral yolla AKR vermişlerdir. Araştırmanın sonuçları, AKR uygulamasının yeni doğan yavruların canlı ağırlıklarında azalmaya, yavruların göz açılma sürelerinin uzamasına, tüylenmenin gecikmesine neden olduğunu ortaya koymuştur (81). Benzer bir deneysel araştırmada, gebeliğin 6. gününden doğum sonrası 21. Günekadar gebe sıçanlara 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/kg dozda AKR oral yolla verilmiştir. Araştırmanın sonunda, yavru canlı ağırlıklarında AKR'nin dozu ile doğru orantılı bir canlı ağırlık azalmasının meydana geldiği tespit edilmiştir(116). ). Krishna ve Muralidhara, gebeliğin 6. gününden başlanarak 19. güne kadar gebe ratlara içme suyu ile 50, 100, 200 ppm dozda AKR uygulamışlardır. Araştırmanın sonuçları, 200 ppm AKR uygulamasının ratların plasenta ağırlıklarında azalmaya neden olduğu, 100 ve 200 ppm AKR uygulamasının ise yeni doğan yavruların canlı ağırlıklarında azalmaya yol açtığını göstermiştir (117).

Bu konuyla ilgili olarak Duarte-Salles ve ark. Norveç'te anne-çocuk üzerinde yaptığı kohort çalışmasında, gebelikte AKR içerikli diyet alımı ve fetal büyümeye etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmaya 50.561 anne dahil edilerek annelerin AKR maruziyet miktarı ve kanda Hb adükt düzeyi ölçümleri yapılmış ve AKR içeren gıdaların alım sıklığı anket sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bu araştırmada, gebelikte AKR alımının, fetal büyüme ile negatif korelasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır. AKR alımının en yüksek olduğu grubun çeyreğindeki gebe kadınlar ile en alt çeyreğindeki kadınlar kıyaslanmış ve gebelikte AKR alımını azaltmanın fetal büyümeyi iyileştirebileceği vurgusu yapılmıştır (118).

Yetişkin insanlarda üreme sistemi hipotalamo-hipofizer-testis aksı ile kontrol edilir. Beslenme, mevsimsel değişim, duygu-düşünce hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımına neden olur, GnRH hipofizi uyarak hipofizden gonadotropin hormonlar olarak bilinen lüteinizan hormon (LH) ve follikül stimulan hormon (FSH) sentez ve salınımını artırır. LH ve FSH kan yolu ile testise ulaşır, LH Leydig hücrelerini uyarak testosteron sentezini, FSH ise Sertoli hücrelerini uyarak androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini artırır. Leydig hücrelerinde sentezlenen testosteron lipofilik olması nedeni ile öncelikle komşu sertoli hücrelerine, bir kısımda kan dolaşımına geçer. Testosteron Sertoli hücrelerinde ABP'e bağlanarak seminifer tübüllere yakın bölgede yüksek konsantrasyona ulaşır, seminifer tübüllerde spermatogenezi uyarır ve spermatogonyumların (kök hücre) olgun sperm hücrelerine dönüşmesini sağlar. Günlük sentezlenen testosteronun çok küçük bir kısmı gerek testiste ve gerekse kan dolaşımı ile ulaştığı karaciğer, yağ ve deri dokularında aromataz tarafından östradiole dönüştürülür. Erkeklerde kan testosteron ve aynı zamanda kan östrodiol düzeylerinin aşırı artması hipotalamo-hipofizer dokularda GnRH, LH ve FSH salınımını azaltarak Leydig hücrelerinde testosteron sentezini ve sonrasında da spermatogenezi baskılar. İnsan ve hayvanlarda hipotalamo-hipofizer-testis aksında meydana gelen hasar ve işleyişindeki bozukluklar erkeklerde kısırlığa neden olur (119).

Son zamanlarda erkeklerde sperm sayılarının ciddi derecede düşmesi, kadınlarda yumurta kalitesinin bozulması ve kısırlık oranlarının dikkate değer artış göstermesi, AKR üzerinde yapılan araştırmaların; AKR'nin üreme sistemi üzerinde meydana getirdiği toksik etkilerin incelenmesi üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. AKR'nin üreme sistemi üzerindeki toksisitesini incelemek üzere çok sayıda deneysel ve klinik araştırma yapılmış ve sonuçları yayımlanmıştır.

Wang ve ark. 5, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg AKR'yi gavaj yoluyla 5 gün boyunca Sprague-Dawley sıçanlarına uygulamıştır. Araştırmanın sonunda hayvanlarda sperm konsantrasyonu azalması, morfolojik sperm bozuklukları gözlemlenmiştir. Aynı zamanda testosteron miktarı ve Leydig hücre sayısında azalma saptamıştır. Histolojik incelemesinde AKR uygulanan gruplarda çok sayıda dev hücre oluşumları, vakuolleşmeler ve apoptotik hücre sayısında artma olduğu bildirilmiştir (80). Özellikle 45 ve 60 mg AKR uygulanan gruplarda vücut ağırlıklarında ve testis ağırlıklarında azalma olduğu görülmüştür. Epididimiste sperm konsantrasyonu azalmış ve seminifer

tübüllerde lezyonlar görülmüş ve aynı zamanda özellikle 60 mg AKR uygulanan gruplarda çok sayıda dev hücreler gözlemlenmiştir.

Mustafa ve ark. yaptığı çalışmada 250-300 g ağırlığında ve 85-90 günlük Sprague-Dawley sıçanlarına 10 gün boyunca 25 ve 50 mg AKR hem oral yolla hem intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Araştırmanın sonuçları, AKR uygulamasının germ hücrelerinin sayısında azalmaya, seminifer epitelin lümene dökülmeye, apoptotik hücrelerde artışa, anormal DNA miktarında artışa, çok çekirdekli dev hücrelerin oluşumuna, interstisyel alandaki damarlarda kan toplanmasına neden olduğunu ortaya koymuştur (120).

Camacho ve ark. çalışmasında Fischer 344 sıçan türü kullanılmıştır. Sıçanlara 14 gün boyunca içme suyunda her gün 2.5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg doza karşılık gelecek şekilde farklı konsantrasyonlarda AKR verilmiştir. AKR'nin doza bağlı olarak serum testosteron düzeyini düşürdüğü, LH'yi arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca germ hücrelerinin lümene dökülmesi, germ hücresi azalması, spermatid hücre olgunlaşmasında gecikme ve primer spermatositlerde apoptosis gibi histopatolojik durumların doza bağlı olarak arttığı görülmüştür. Bunun yanında testis ağırlığı 50 mg/kg doz AKR verilen grupta düşerken, total Leydig hücre sayısında gruplar arasında bir farklılığa rastlanmamıştır (121).

Rajeh ve ark. Sprague-Dawley sıçanlarına 5 gün boyunca oral yolla 5, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg/gün AKR uygulayarak yaptıkları araştırmalarında, son dozdan AKR uygulamasından 72 saat sonrasında hayvanları kurban etmişlerdir. Özellikle 45 ve 60 mg/kg AKR verilen gruplarda saldırganlık, testislerinde büyüme, arka bacaklarında zayıflık ve dengesiz hareket etme gözlemlenmiştir. Hayvanların ağırlıkları 5. günün sonuna kadar önemli derecede azalmış fakat son 3 günde bazılarında artış gözlemlenmiştir. Testis ağırlık indekslerinin 15, 45 ve 60 mg/kg AKR verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, 5 ve 30 mg/kg AKR verilen gruplarda testis ağırlık indeksinin arttığını ancak bu artışın anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Sperm rezervlerinde azalma ve anormal spermler gözlemlenmiştir. Histolojik olarak germinal hücrelerde dejenerasyon, bazal vakuolleşmeler, çok çekirdekli dev hücreler, atrofiye olmuş Leydig hücreleri ve lümende daha az spermatozoa görüldüğü ifade edilmiştir (122).

Tyl ve ark. 11 haftalık Long-Evans sıçanlarıyla yaptığı çalışmada sıçanlara 5 gün boyunca 0, 5, 15, 30, 40 ve 60 mg/kg AKR'yi 5 gün boyunca oral yolla vermiş ve 8. gün dişi sıçanlarla çiftleştirmişlerdir. Çalışma sonunda 15, 30, 45 ve 60 mg AKR uygulanan sıçanların vücut ağırlığı önemli derecede azalmış, dozla orantılı olarak dengesiz hareket etme ve bazılarında piloereksiyon, kıllarda kabalaşma ve uyuşukluk gözlenmiştir. Gruplar arası ön bacak kavrama gücü eşit bulunurken, arka bacak kavrama gücü özellikle 60 mg AKR uygulanan grupta çok düşük bulunmuştur. Dişilerle çiftleşebilen erkek sayısı ve çiftleştikten sonra gebe kalan dişi sayısı doza bağlı olarak azalmıştır. İmplantе olan canlı embriyo sayısı azalmıştır (123).

Shelby ve ark. erkek farelere farklı dozlarda i.p. olarak AKR vermişler ve dişi farelerle farklı günlerde çiftleşmeleri sağlanmıştır. Deney sonunda implante olan embriyo sayıları, gebe fare sayıları gibi parametrelere bakılmıştır. Sonuç olarak AKR'nin geç spermatidlerde ve spermatozoonlarda ölümcül mutasyonlara neden olduğu bulunmuştur (124).

Kermani-Alghoraishi ve ark. 8-10 haftalık, 25-30 g farelere içme suyuyla iki ay boyunca 5 ve 10 mg/kg AKR vermişlerdir. 2 ay sonra sperm parametre analizi ve zar bütünlüğünü değerlendirmek üzere hipoozmotik şişme testi yapılmıştır. Sonuç olarak AKR farelerin sperm zarı bütünlüğünü bozduğu, canlı sperm sayısını azalttığı, anormal sperm oluşumunu tetikleyerek sperm hareketliliğini azalttığı bildirilmiştir (125).

Yassa ve ark. çalışmalarında 180-200 g Sprague-Dawley sıçanları kullanılmıştır. 90 gün boyunca sıçanlara 15 mg/kg ve 30 mg/kg oral olarak AKR verilmiş ve yeşil çay ekstraktının koruyucu etkisine bakılmıştır. Sadece AKR verilen gruplarda germ hücrelerinde dejenerasyon, tübüllerde küçülme ve dev hücre oluşumu görülmüş, vücut ağırlıkları azalmış ve testosteron seviyesi düşmüştür. Yeşil çay ekstraktıyla beraber AKR verilen gruplarda önemli derecede bir düzelme saptanmıştır (126). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da AKR verilen grupta seminifer tübül çapları küçüldü, seminifer epitelde birçok dev hücrelere rastlandı ve vücut ağırlıklarında ve serum testosteron düzeylerinde düşüş gözlemlendi.

Şen ve ark. ortalama 25 g ağırlığında mus musculus türündeki dişi farelere gebeliğin 6. gününden, doğum sonrası 21. güne kadar 14 mg/kg AKR vermişler ve bu periyot içerisinde yavru erkek fareleri incelemişlerdir. Sonuç olarak doğan yavruların doğum ağırlığı ve testis indekslerini kontrole göre düşük bulmuşlardır. Deney sonunda

yaptıkları histopatolojik incelemelerde ise AKR maruz kalan farelerde seminifer tübüllerde atrofi, dev hücreler, bağ dokusunda deformasyon, Leydig, Sertoli ve spermatogenik hücrelerde azalma görülmüştür (127).

Erdemli ve ark. Tarafından yapılan bir deneysel araştırmada gebelik boyunca AKR maruziyeti ve bu maruziyete karşı koruyucu olarak antioksidan E vitamini uygulanan ratların, yavrularının testis dokuları incelenmiş. Maternal AKR maruziyetinin rat testis dokusunda oksidatif strese yol açarak hasar oluşturduğu ve bu hasarın E vitamini ile anlamlı ölçüde gerilediği gözlenmiştir. Gıda kaynaklı AKR toksisitesine maruz kalmanın her geçen gün arttığı ve infertilitede de görülen paralel artışın AKR toksisitesiyle ilişkili olabileceğine dikkat çekilmiş ve bu konuda daha ileri çalışmalara gerek duyulduğuna vurgu yapılmıştır(128).

Bizim araştırmamızda anne ratlara gebelik ve laktasyon süresince, erkek yavrulara doğum sonrası 8. haftaya kadar AKR ve E vitamini uygulanmış ve doğumu takip eden 8. haftanın sonunda erkek yavrudan alınan testis dokularının histopatolojik incelemelerine ilaveten, testosteronu östrojene dönüştüren aromataz enziminin gen transkripsiyon ve proteine dönüşme düzeyleri ve serum testosteron, östradiol, LH, FSH düzeyleri analiz edilmiştir. Ayrıca, sıçanlardan alınan sperm örneklerinin spermiyogram analizleri (sperm sayısı, sperm hareketliliği, sperm morfolojisi) yapılmış ve AKR'nin testislerde meydana getirdiği toksik etkilerin moleküler düzeydeki etki mekanizma/mekanizmaları ortaya konulmaya çalışılmış, E vitamininin AKR kaynaklı bu toksik etkileri ne derece engelleyebildiği de test edilmiştir.

Üreme dokularının ağırlık ölçümleri, AKR uygulamasının, testis ağırlıklarında ciddi derecede düşürdüğünü, AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulamasının AKR'nin testis ağırlıkları üzerinde meydana getirdiği bu ciddi negatif etkisini kısmen engelleyebildiğini; epididimis ağırlıklarının AKR uygulanan grupta önemli derecede düştüğünü, AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulamasının AKR'nin epididimis ağırlığı üzerinde meydana getirdiği bu etkiyi kısmen düzeltebildiğini; AKR'nin seminal vezikül ağırlık üzerinde kayda değer bir etki oluşturmadığını; prostat ağırlıklarında istatistiki olarak anlamlı bir artış meydana getirdiğini orta koymuştur. AKR'nin üreme dokularında meydana getirdiği ağırlık azalmaları: (1) AKR'nin bu dokularda hücre yapısını hasarlandırarak hücre proliferasyon ve rejenerasyon hızını düşürmesinden, (2) bu dokularda genel olarak protein sentezini baskılamasından, (3) AKR uygulamasının

ratların iştahlarını baskılayarak yem ve su tüketimini azaltmasından kaynaklanmış olabileceğini düşünöyoruz.

SpermİYogram sonuçları, AKR uygulamasının sperm hareketliliği üzerinde kısmı bir azalmaya neden olduğunu ve AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulamasının sperm hareketliliğini kontrol grubu değerlerine getirdiğini; AKR'nin epididimal sperm konsantrasyonunu ciddi derecede düştüğünü, AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulamasının, AKR'nin epididimal sperm konsantrasyonu üzerinde meydana getirdiği bu negatif etkiyi kısmen engelleyebildiğini ortaya koymuştur. AKR'nin epididimal sperm konsantrasyonunu anlamlı derecede düşürmesi: (1) AKR'nin testis dokusunda meydana getirdiği histopatolojik hasarlara bağlı spermatogonyum kaybından, spermatid ve spermatozoonlarda yapısal bozulmaların artmasından, (2) AKR'nin testisin Leydig hücrelerinde meydana getirdiği hasarlardan, (3) AKR ve/veya AKR yıkılım ürünlerinin karaciğerde aromataz aktivitesini artırarak testosteronun östradiole dönüşümünü hızlandırmasından, (4) tüm bu faktörlerin etkisi ile serum testosteron düzeyinin düşmesi ve spermatogenez hızının yavaşlamasından kaynaklanmış olabileceğini düşünöyoruz.

AKR uygulanan grupta total anormal sperm oranı, baş ve kuyruk anomalili sperm oranı ciddi derecede artış göstermiş, AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması total anormal sperm oranı, baş ve kuyruk anomalili sperm oranını kontrol grubu değerlerine düşürmüştür. E vitamininin anormal sperm oranı üzerinde meydana getirdiği anlamlı iyileştirme, E vitamininin, AKR'nin testis dokusunda meydan getirdiği histopatolojik hasarları, spermatogonyum kaybını, spermatid ve spermatozoonlarda yapısal bozulmaları önemli oranda azaltmasından kaynaklanmış olabileceğini düşünöyoruz.

Gruplarda ölçölen hormon düzeyleri incelendiğinde, AKR uygulaması serum LH ve FSH üzerinde kısmı olmak üzere, özellikle serum testosteron düzeyini anlamlı derecede düşürdüğü, serum östradiol düzeyini ciddi derecede artırdığı, AKR + E vitamini grubunda E vitamini uygulaması serum hormon düzeylerini kontrol grubu değerlerine getirdiği görölmektedir. AKR uygulamasının serum testosteron düzeylerini anlamlı derecede düşürmesi: (1) AKR'nin Leydig hücrelerinde meydana getirdiği hasarlardan, (2) AKR ve/veya AKR yıkılım ürünlerinin karaciğerde aromataz aktivitesini artırarak testosteronun östradiole dönüşümünü hızlandırmasından kaynaklanmış olabilir. AKR + E vitamini grubunda hormon düzeylerinin normale dönmesi, AKR kaynaklı Leydig hücre hasarını engellemesinden ve karaciğerde AKR

ve/veya AKR yıkılım ürünleri kaynaklı aromataz proteini artışını baskılamasından kaynaklanmış olabileceği kanaatindeyiz.

RT-PCR ve Western blot analizi sonuçları, AKR uygulaması testiste aromataz geninin mRNA düzeylerini (aromataz geni transkripsiyon düzeyi) anlamlı derecede artırmış, ancak mRNA'nın aromataz proteinine dönüşümünü etkilememiştir. AKR, testiste aromataz geninin transkripsiyonunu artırırken, aromatazın mRNA'sının translasyonunu etkilememiştir. Buna mukabil, AKR karaciğerde aromataz proteinini anlamlı derecede artırmıştır. AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması karaciğerde aromataz proteini düzeyini kontrol grubu değerlerine düşürmüştür.

Her ne kadar daha önceki yıllarda yapılan araştırmalarda, AKR uygulamasının üreme dokularında (testis, epididimis gibi) ağırlık azalmasına neden olduğu, testis dokusunda histopatolojik hasarlara yol açtığı, sperm konsantrasyonunu ve serum testosteron düzeylerini anlamlı derecede düşürdüğü, serum östradiol düzeylerini ciddi derecede artırdığı rapor edilmiş olmasına rağmen, bizim sonuçlarımız bu araştırmaların sonuçlarını teyid etmekle birlikte, araştırmamız en önemli farkları: (1) AKR uygulamasının gebelik ve laktasyon süresince ve erkek yavruların cinsel olgunluğa eriştiği 8. haftaya kadar uygulanmış olması, AKR'nin üreme sisteminde meydana getirdiği hasar tablosunun tam olarak görülmüş olması, (2) daha da önemli bir fark ise, AKR'nin serum testosteron düzeylerinin düşürmesinin ve serum östradiol düzeylerini artırmasının yeni bir muhtemel mekanizmasının ortaya konulmuş olması, (3) AKR uygulamasının karaciğerde aromataz protein düzeylerini anlamlı derecede artırdığı, artan karaciğer aromatazının testosteronun östradiole dönüşüm hızını artırarak serum testosteron düzeyini düşürdüğü tezinin, ilk defa tarafımızca ortaya konulmuş olmasıdır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gebeliklik ve laktasyon süresince annelere, doğum sonrası 8. haftaya kadar erkek yavrulara AKR uygulanarak yapılan araştırmamızın sonuçları:

1. AKR uygulaması erkek yavru ratlarda testis, epididimis doku ağırlıklarını önemli derecede azaltırken, prostat ağırlığını anlamlı derecede artırmış, seminal vezikül ağırlığını etkilememiştir. Ancak, AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması testis ve epididimis doku ağırlıkları üzerinde önemli oranda artırıcı etki göstermiştir.
2. Spermiyogram sonuçları, AKR uygulamasının erkek yavru ratlarda sperm motilitesi üzerindeki etkisi çok sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte epididimal sperm konsantrasyonunu önemli oranda azaltmış, anormal sperm oranını; özellikle spermlerde kuyruk anomali oranını anlamlı derecede artırmıştır. AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması epididimal sperm konsantrasyonu üzerindeki pozitif etkisi sınırlı kalmış, ancak anormal sperm oranını kontrol grubu değerlerine düşürmüştür.
3. AKR uygulaması erkek yavruların testislerinde, özellikle Leydig hücrelerinde dejenerasyona, seminifer tubüllerde atrofi ve dejenerasyona, spermatogonyum kayıplarına neden olmuştur. AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması AKR kaynaklı Leydig hücre dejenerasyonunu önemli derecede azaltmış ve Leydig hücrelerini normal histomorfolojik görünüme getirmiştir.
4. Erkek yavru ratlarda serum hormon analizleri, AKR uygulanmasının serum testosteron düzeylerini anlamlı derecede düşürdüğünü, serum östradiol seviyeleri önemli oranda artırdığını, LH ve FSH düzeylerindeki etkisinin ise sınırlı düzeyde kaldığını ortaya koymuştur. Ancak, AKR+E vitamini grubunda E vitamini uygulaması serum testosteron düzeylerini anlamlı derecede artırırken, serum östradiol seviyelerini önemli oranda düşürmüştür.
5. RT-PCR ve Western-blot sonuçları, AKR uygulamasının erkek yavruların testislerinde aromataz geninin transkripsiyonunu artırdığını, ancak bu artışın translasyona (aromataz proteininin sentezi) yansımadığını göstermiştir. Yani

AKR testislerde aromataz geninin transkripsiyonunu artırmış ancak translasyon aşamasını etkilememiştir. Erkek yavruların karaciğer numunlerinde yapılan western-blot analizleri ise, AKR'nin karaciğer aromatazının protein düzeyini ciddi derecede artırdığını ortaya koymuştur.

6. AKR'nin karaciğerde aromataz proteininin düzeyini anlamlı derecede artırmış olmasını, AKR uygulamasının serum testosteron düzeyini düşürmesinin muhtemel bir mekanizması olabileceğini düşünüyoruz. Testis dışındaki aromataz kaynakları olan özellikle yağ ve kas dokuda yapılacak araştırmalarda, AKR'nin yağ ve kasda da aromataz proteininin düzeyini artırdığının tespit edilmesi, AKR kaynaklı üreme problemlerinin çözümünde aromataz inhibitörleri ile tedavi protokollerini gündeme getirebileceği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak, dünyada klasik yemek kültürü yerine; yüksek sıcaklıklarda hazırlanan fırınlanmış, kızartılmış ve fast-food türü gıdaların tüketiminin çok yaygın olması nedeni ile, insanların AKR'ye maruz kalmamaları mümkün görünmemektedir. Bu nedenle erkeklerin üreme sağlığını korumaları için; kızartma, fırınlama ve fast-food gibi 120 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda hazırlanan gıdalarda yoğun miktarda AKR oluşması nedeni ile gıda kaynaklı AKR maruziyetini en aza indirmek için günlük diyetlerinde mümkün olduğunca geleneksel haşlama yöntemi ile hazırlanmış gıdaları tüketmelerini ve üreme sisteminde AKR kaynaklı muhtemel toksik etkileri en aza indirmek için günlük yeteri miktarda E vitamini almalarını öneriyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Luning P, Sanny M. *Acrylamide in Fried Potato Products*. In *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, NewYork, Elsevier, 2016:159-79.
2. Park JH, Penning TM. *Polyaromatic hydrocarbons*. In: *Stadler RH, Lineback DR (eds). Process induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*, New Jersey, John Wiley and Sons Inc, 2009.
3. Törnqvist M, Ehrenberg L, Hagmar L. *Leakage of Acrylamides from a Tunnel Construction Work: Exposure Monitoring and Effects to Humans and Animals*. MS for European ALARA Network workshop. Antwerp. Belgium. 2000: 1-8.
4. Bergmark E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol* 1997, 10: 78–84.
5. Arusoğlu G. Akrilamid Oluşumu ve insan Sağlığına Etkileri. *Akademik Gıda* 2015, 13 (1): 61-7.
6. Marlowe C, Clark M, Mast R, Friedman M, Waddell W. The distribution of (14C) acrylamide in male and pregnant swiss-webster mice by wholebody autoradiography. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986, 86: 457–65.
7. Sörgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C. Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* 2002, 48(6): 267-74.
8. Mojska H, Gielecińska I, Winiarek J, Sawicki W. Acrylamide Content in Breast Milk: The Evaluation of the Impact of Breastfeeding Women's Diet and the Estimation of the Exposure of Breastfed Infants to Acrylamide in Breast Milk. *Toxics* 2021, 9(11): 298.
9. Hogervorst J, Vesper HW, Madhloum N, Gyselaers W, Nawrot T. Cord blood acrylamide levels and birth size, and interactions with genetic variants in acrylamide-metabolising genes. *Environ Health* 2021, 20(1): 35.

10. Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SP, Müller DJ, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, Scimeca JA, Slimani N, Törnqvist M, Tuijthelaars S, Verger P. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol* 2005, 43: 365-410.
11. Hogervorst JGF, Schouten LJ, Konings EJM, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Dietary acrylamide intake and brain cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, 18(5): 1663-6.
12. Pruser KN, Flynn NE. Acrylamide in health and disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011, 3: 41-51.
13. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 2002, 50: 4998-5006.
14. Anonim, Update on acrylamide in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA J* 2012, 10(10): 2938.
15. Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C. Acrylamide: Review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit Rev Toxicol* 2006, 36: 481-608.
16. Health implications of acrylamide in food: report of a joint FAO/WHO consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42563> Son Erişim Tarihi 05 Ocak 2022
17. Soares C, Alves RC, Oliveira M. Factors Affecting Acrylamide Levels in Coffee Beverages. Xu F, Concha M, Elmore J. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chem* 2016, 210: 163-171.
18. Xu F, Concha M, Elmore J. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry* 2016, 210: 163-171.
19. Pedreschi F, Mariotti MS, Granby K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J Sci Food Agric* 2014, 94(1): 9-20.
20. Khezerlou A, Alizadeh-Sani M, Zolfaghari Firouzsafari N, Ehsani A. Formation, Properties, and Reduction Methods of Acrylamide in Foods: A Review Study. *J Nutrition Fasting Health* 2018, 6(1): 52-9.

21. Hasanin NA, Sayed NM, Ghoneim FM, Al-Sherief SA. Histological and Ultrastructure Study of the Testes of Acrylamide Exposed Adult Male Albino Rat and Evaluation of the Possible Protective Effect of Vitamin E Intake. *J Microsc Ultrastruct* 2018, 6(1): 23-34.
22. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji*. Başaklar C, (Çeviren). Ankara: Palme Yayıncılık, 1993.
23. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F, (Çevi Editörleri). 7. Baskı, İstanbul: Güneş Kitabevi, 2009.
24. Madazlı R. *Plasenta*, 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008.
25. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res* 1988, 195: 45–77
26. Ghanayem BI, McDaniel LP, Churswell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennel RT. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glisidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol Sci* 2005, 88 (2): 311–18.
27. Gloc BJ, Wozniak E, Czechowska AK. Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interac* 2004, 149: 137–49.
28. Overview of acrylamide toxicity and metabolism. JIFSAN/NCFST Workshop on acrylamide in Food and Toxicology and Metabolic Consequences Working Group, 2002.
29. Lingnert H, Grivas S, Jagerstad M, Skog K, Törnqvist M, Aman P. Acrylamide in food: mechanism of formation and influencing factors during heating of foods. *Scand Nutr* 2002, 46(4): 159–72.
30. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002, 419: 449–50.
31. Rosen J, Hellenas KE. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst* 2002, 127: 880-2.
32. Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW. Acrylamide in foods: Occurrence, sources and modelling. *J Agric Food Chem* 2003, 51(3): 802-8.

33. JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting, JECFA/64/SC, World Health Organization WHO. Rome Italy 2005, 7–17.
34. U.S. Food and Drug Administration. The Action Plans for Acrylamide in Food. 2002–05.
35. Ölmez H, Tuncay F, Özcan N, Demirel S. A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *J Food Comp Anal* 2008, 21: 564-8.
36. Margaretha J, Kertsin A, Skog B. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* 2005, 574: 156–72.
37. Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization. Health Implications of Acrylamide in Food, Report of a Joint FAO/WHO consultation. Health Organization, Geneva 2002. Available at <http://www.who.int/fsf/acrylamide/summaryreportfinal.pdt> Son Erişim Tarihi 10 Aralık 2021
38. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem* 2003, 51: 4504–26.
39. Isla MI, Vattuone MA, Sampietro AR. Hydrolysis of sucrose within isolated vacuoles from *Solanum tuberosum* L. tubers. *Planta* 1998, 205: 601–5.
40. Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, and Villagran MD. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem* 2003, 51(16): 4782-87.
41. Anese M, Nicoli MC, Verardo G, Munari M, Mirolo G, Bortolomeazzi R. Effect of Vacuum Roasting on Acrylamide Formation and Reduction in Coffee Beans. *Food Chem* 2014, 145: 168-72.
42. Yıldız HG, Palazoğlu TK, Miran W, Kocadağlı T, Gökmen V. Evolution of surface temperature and its relationship with acrylamide formation during conventional and vacuum-combined baking of cookies. *J Food Eng* 2017, 197: 17-23.
43. Tang S, Avena-Bustillos RJ, Lear M, Sedej I, Holstege DM, Friedman M, McHugh TH, Wang SC. Evaluation of thermal processing variables for reducing acrylamide in canned black ripe olives. *J Food Eng* 2016, 191: 124-30.

44. Casado FJ, Sánchez AH, Montaña A. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chem* 2010, 119: 161–6.
45. Michalak J, Gujska E, Czarnowska-Kujawska M, Nowak F. Effect of different home-cooking methods on acrylamide formation in pre-prepared croquettes. *J Food Compos Anal* 2017, 56: 134–39.
46. Sansano M, Castello ML, Heredia A, Andres A. Protective effect of chitosan on acrylamide formation in model and batter systems. *Food Hydrocoll* 2016, 60: 1-6.
47. Yakıcı T. Farklı Reçetelerle Üretilen Bisküvilerde Aroma ve Akrilamid Oluşumu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yayınlanmamış Doktora Tezi. Tekirdağ: Namık Kemal Üniversitesi, 2012.
48. Bartkiene E, Jakobsone I, Pugejeva I, Bartkevics V, Zadeike D, Juodeikiene G. Reducing of acrylamide formation in wheat biscuits supplemented with flaxseed and lupine. *Food Sci Technol* 2016, 65: 275-82.
49. Akıllıoğlu HG, Gökmen V. Mitigation of acrylamide and hydroxymethyl furfural in instant coffee by yeast fermentation. *Food Res Int* 2014, 61: 252-56.
50. Mesías M, Morales FJ. Acrylamide in commercial potato crisps from Spanish market: Trends from 2004 to 2014 and assessment of the dietary exposure. *Food Chem Toxicol* 2015, 81: 104-10.
51. Urbancic S, Kolar MH, Dimitrijevic D, Demsar L. Stabilization of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying. *Food Sci Technol* 2014, 57: 671-8.
52. Meghavarnam AK, Janakiraman S. Evaluation of acrylamide reduction potential of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* (ASP-87) in starchy products. *Food Sci Technol* 2018, 89: 32-7.
53. Ciesarová Z, Kukurová K, Mikušová L, Basil E, Polakovičová P, Duchoňová L, Vlček M, Šturdík E. Nutritionally enhanced wheat-oat bread with reduced acrylamide level. *Qual Assur Saf Crop Foods* 2014, 6 (3): 327-34.
54. Gonçalves Dias FF, Junior SB, Hantao LW, Augusto F, Sato HH. Acrylamide mitigation in French fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *Food Sci Technol* 2017, 76(Part B): 222-9.

55. Muttucumaru N, Powers SJ, Elmore JS, Dodson A, Briddon A, Mottram DS, Halford NG. Acrylamide-forming potential of potatoes grown at different locations, and the ratio of free asparagine to reducing sugars at which free asparagine becomes a factor for acrylamide formation. *Food Chem* 2017, 220: 76-86.
56. Collins JJ, Swaen GM, Marsh GM, Utidjian HM, Caporossi JC, Lucas LJ. Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J Occup Med* 1989, 31: 614-7.
57. Olesen PT, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int J Cancer* 2008, 122: 2094-100
58. Ariseto AP, Vicente E. Estimate of Acrylamide Intake from Coffee and Health Risk Assessment. In Preedy VR (ed). *Coffee in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Elsevier, 2015: 575-84.
59. Karagöz A. Akrilamid ve Gıdalarda Bulunuşu. *TAF Prev Med Bull* 2009, 8(2): 187-92.
60. Kocadağlı T, Gökmen V. Metabolism of Acrylamide in Humans and Biomarkers of Exposure to Acrylamide. In Gokmen V (ed). *Acrylamide in Food*, Academic Press, 2015: 109-28.
61. Arusoğlu G. Akrilamid Oluşumu ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Akademik Gıda* 2015, 13(1): 61-7.
62. Baker MK, Nagy TR, Barnes S, Groopman J. Dietary Acrylamide and Human Cancer: A systematic Review of Literature. *Nutr Cancer* 2014, 66 (5): 774-90.
63. Hagmar L, Tornqvist M, Nordander C, Rosen I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aprea , Granath F, Axmon A. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand J Work Environ Health* 2001, 27: 219-26.
64. LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicol* 2004, 25: 617-30.

65. Sickles DW, Brady ST, Testino A, Friedman MA, Wrenn RW. Direct effect of the neurotoxican tacrylamide on kinesin-based microtubule motility. *J Neurosci Res* 1996, 46: 7-17.
66. Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S, Groopman J. Dietary Acrylamide and Human Cancer: A systematic Review of Literature. *Nutr Cancer* 2014, 66(5): 774-90.
67. Klauning JE. Acrylamide carcinogenicity. *J Agric Food Chem* 2008, 56(15): 5984-8
68. Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Segal GA, Brusick DJ. Acrylamide: A review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res* 1995, 330: 71–99.
69. Ao L, Cao J. Genotoxicity of Acrylamide and Glycidamide: A Review of the Studies by HPRT Gene and TK Gene Mutation Assays. *Gen Environ* 2012,34(1): 1-8.
70. Sakamoto J, Hashimoto K. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice - effects on fertility and sperm morphology. *Arch Toxicol* 1986, 59(4): 201-5.
71. Sakamoto J, Kurosaka Y, Hashimoto K. Histological changes of acrylamide-induced testicular lesions in mice. *Exp Mol Pathol* 1988, 48(3): 324-34.
72. Segal GA, Generoso EE, Brimer PA, Mallin HV. Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled dna synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA. *Environ Mol Mutagen* 1990, 16(3): 137-42.
73. Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han DU, Chae C, Han CH. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular 80 gene expression profile. *Reprod Toxicol* 2005, 19(4): 527-34.
74. Ivanski F, de Oliveira VM, de Oliveira IM, de Araújo Ramos AT, de Oliveira Tonete ST, de Oliveira Hykavei G, Bargi-Souza P, Schiessel DL, Martino-Andrade AJ, Romano MA, Marino Romano R. Prepubertal acrylamide exposure causes dose-response decreases in spermatogenic production and functionality with modulation of genes involved in the spermatogenesis in rats. *Toxicology* 2020, 436: 152428.
75. Gassner P, Adler ID. Induction of hypoploidy and cell cycle delay by acrylamide in somatic and germinal cells of male mice. *Mut Res* 1996, 367(4): 195-202.

76. Adler ID, Schmid TE, Baumgartner A. Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm–FISH assay: a review of the present data base. *Mut Res* 2002, 504(1–2): 173-82.
77. Shelby MD, Cain KT, Cornett CV, Generoso WM. Acrylamide: Induction of heritable translocations in male mice. *Environ Mut* 1987, 9(4): 363-8.
78. Farombi EO, Ugwuezunmba MC, Ezenwadu TT, Oyeyemi MO, Ekor M. Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: effects of vitamin C and N-acetylcysteine. *Exp Toxicol Pathol* 2008, 60(1): 77-85.
79. Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, Supriya C. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol* 2011, 25(4): 247-53.
80. Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, Shi F. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod Toxicol* 2010, 29(2): 225-30.
81. Allam A, El-GhareebAA, Abdul-HamidM, Baikry A, SabriMI. Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: Biochemical and morphological studies. *Toxicol Industrial Health* 2011, 27(4): 291–306.
82. El-Sayyad HI, Abou-Egla MH, El-Sayyad FI, El-Ghawet HA, Gaur RL, Fernando A, Raj MH, Ouhtit A. Effects of fried potato chip supplementation on mouse pregnancy and fetal development. *Nutr* 2011, 27: 343–50
83. Ogawa B, Wang L, Taniai TOE, Akane H, Suzuki K, Mitsumori K, Shibutani M. Reversible aberration of neurogenesis targeting late-stage progenitor cells in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to acrylamide. *Arch Toxicol* 2012, 86: 779–90.
84. Evans HM and Bishop KS. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science* 1922, 56(1458): 650-651.
85. Zintzen H. Vitamin E/selenium in ruminants. *News and reviews*. Basel: La Roche;1972.
86. Evans HM. The Pioneer history of vitamin E. *Vitam Horm* 1976, 20: 379.
87. Korner FW, Voom J. *Vitamins*. Basel: La Roche;1978.

88. Combs GF, Noguchi T, Scott ML. Mechanisms of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Federation Proc* 1975, 34: 11.
89. Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol* 1993, 16: 16-9.
90. Van-Der-Meulen JH, McArdle A, Jackson MJ, Faulkner JA. Contraction– induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: The role of vitamin E. *J Appl Physiol* 1997, 83: 917-23.
91. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991, 53: 1050-5.
92. Evelson P, Ordonez CP, Liesuy S, Boveris A. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J Photochem Photobiol B* 1997, 38: 215-9.
93. Stratton SP, Liebler DC. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochem* 1997, 36: 12911-20.
94. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* 2002, 35: 67–86.
95. Sung S, Yao Y, Uryu K. Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces beta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2004, 18: 323–5.
96. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 186: 944–50
97. Lee P, Ulatowski LM. Vitamin E: Mechanism of transport and regulation in the CNS. *IUBMB Life* 2019, 71(4): 424-9.
98. Spector R, Johanson CE. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. *J Neurochem* 2007, 103(2): 425-38.
99. Hidiroglu N, Madere R, McDowell LR. Maternal transfer of vitamin E to fetal and Neonatal guinea pigs utilizing a stable isotopic technique. *Nutr Res* 2001, 21: 771-83.

100. Rota C, Rimbach G, Minihane AM, Stoecklin E, Barella L. Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties. *Nutr Neurosci* 2005, 8: 21–9.
101. Betti M, Mineli A, Ambrogini P, Ciuffoli S, Viola V, Gali F, Canonico B, Lattanzi D, Colombo E, Sestili P, Cuppini R. Dietary supplementation with  $\alpha$ -tocopherol reduces neuroinflammation and neuronal degeneration in the rat brain after kainic acid-induced status epilepticus. *Free Radi Res* 2011, 45(10): 1136–42.
102. Galal MK, Khalaf AAA, Ogaly HA, Ibrahim MA. Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC Complemen Alternat Med* 2014, 14: 458.
103. Kosta P. Effect of piracetam and vitamin E on phosphamidon-induced impairment of memory and oxidative stress in rats. *Drug Chem Toxicol* 2013, 36(1): 48–54.
104. <http://tr.mydearbody.com/vitaminler/e-vitamini.html> Son Erişim Tarihi 06 Ekim 2021
105. [http://tr.wikipedia.org/wiki/E\\_vitamini](http://tr.wikipedia.org/wiki/E_vitamini) Son Erişim Tarihi 01 Şubat 2021
106. Alzoubi KH, Khabour OF, Rashid BA, Damaj IM, Salah HA. The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: The role of oxidative stres. *Behav Bra Res* 2012, 226: 205–10.
107. Ciftci O, Aydin M, Ozdemir I, Vardi N. Quercetin prevents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced testicular damage in rats. *Andrologia* 2012, 44(3): 164-73.
108. Ciftci O, Cetin A, Aydin M, Kaya K, Oguz F. Fish oil, contained in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, attenuates testicular and spermatological damage induced by cisplatin in rats. *Andrologia* 2014, 46(10): 1161-8.
109. Erdemli ME, Turkoz Y, Altinoz E, Elibol E, Dogan Z. Investigation of the effects of acrylamide applied during pregnancy on fetal brain development in rats and protective role of the vitamin E. *Hum Exp Toxicol* 2016, 35(12): 1337-44.
110. WHO - World Health Organization, Acrylamide, In: Guidelines for drinking water quality, health criteria and other supporting information, International Programme on Chemical Safety, Second ed. Geneva, Switzerland 1996.

111. Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW. Acrylamide in foods; occurrence, source. Los Angeles CA. *AOAC Annual Meeting* 2002,22–26.
112. Ruden C. Acrylamide and cancer risk–expert risk assessments and the public debate, *Food Chem Toxicol* 2004, 42: 335–49.
113. JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting, JECFA/64/SC, World Health Organization WHO, Rome, Italy 2005, 7–17.
114. Edwards PM. The insensitivity of the developing rat foetus to the toxic effects of acrylamide. *Chem Biol Interact* 1976, 12: 13-8.
115. Sörgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C. Acrylamide: Increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* 2002, 48(6): 267-74.
116. Ferguson SA, Garey J, Smith ME, Twaddle NC, Doerge DR, Paule MG. Prewaning behaviors, developmental landmarks, and acrylamide and glycidamide levels after pre- and postnatal acrylamide treatment in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2010, 32: 373–82.
117. Krishna G, Muralidhara P. Inulin supplementation during gestation mitigates acrylamide-induced maternal and fetal brain oxidative dysfunctions and neurotoxicity in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2015, 49: 49–58.
118. Duarte-Salles T, von Stedingk H, Granum B, Gützow KB, Rydberg P, Törnqvist M, Mendez MA, Brunborg G, Brantsæter AL, Meltzer HM, Alexander J, Haugen M. Dietary acrylamide intake during pregnancy and fetal growth-results from the Norwegian mother and child cohort study (MoBa). *Environ Health Perspect* 2013, 121(3): 374-9.
119. Hall JE, Hall ME (eds). *Medical Physiology*. Çeviri: Yeğen BÇ, Alican İ, Solakoğlu Z. *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*, 14. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2021.
120. Mustafa HN. Effect of acrylamide on testis of albino rats. Ultrastructure and DNA cytometry study. *Saudi Medical Journal* 2012, 33(7): 722-31.

121. Camacho L, Latendresse JR, Muskhelishvili L, Patton R, Bowyer JF, Thomas M, Doerge DR. Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicol Lett* 2012, 211(2): 135-43.
122. Rajeh N, Al Saggaf S, Ayuob N, ElAssouli S. Characterization of Acrylamide Mediated Testicular Toxicity in Rat: Light and Electron Microscopic Study. *Kuwait Med J* 2011, 43(3): 196-205
123. Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Ross WP, Friedman MA. Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod Toxicol* 2000, 14(2): 147-57.
124. Shelby MD, Cain KT, Hughes LA, Brade, PW, Generoso WM. Dominant lethal effects of acrylamide in male mice. *Mut Res Lett* 1986, 173(1): 35-40.
125. Kermani-Alghoraishi M, Anvari M, Talebi AR, Amini-Rad O, Ghahramani R, Miresmaili SM. The effects of acrylamide on sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice. *Eur J Obstet & Gynecol Reprod Biol* 2010, 153(1): 52-5.
126. Yassa HA, George SM, Refaiy AERM, Moneim EMA. Camellia sinensis (green tea) extract attenuate acrylamide induced testicular damage in albino rats. *Environ Toxicol* 2013, 29(10): 1155–61.
127. Sen E, Tunali Y, Erkan M. Testicular development of male mice offsprings exposed to acrylamide and alcohol during the gestation and lactation period. *Hum Exp Toxicol* 2015, 34(4): 401-14.
128. Erdemli Z, Erdemli ME, Turkoz Y, Gul M, Yigitcan B, Gozukara Bag H. The effects of acrylamide and Vitamin E administration during pregnancy on adult rats testis. *Andrologia* 2019, 51(7):e13292.